

Institut für Biologie

DISSERTATION

**Genetische Analyse von Conductin durch
zielgerichtete Mutagenese in der Maus**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

Boris-Alexander Jerchow

*21. Dezember 1969 in Freiburg i. Brsg.

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. H. Saumweber
2. Prof. Dr. R. Schäfer
3. Prof. Dr. W. Birchmeier

Datum der Promotion: 6. Mai 2003

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Walter Birchmeier am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin, durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung	6
1	Einleitung	7
1.1	Der Wnt-Signalweg	9
1.2	Inaktivierung des Abbaukomplexes.....	14
1.3	Aktivierung von Zielgenen des kanonischen Wnt-Signalwegs	15
1.4	Der Wnt-Signalweg in der Tumorentstehung	16
1.5	Der Wnt-Signalweg in der Embryogenese.....	18
1.6	Der Hedgehog-Signalweg	20
1.7	Die Ausbildung des Telenzephalons	24
1.8	Holoprosenzephalie	30
1.9	Zielsetzung	32
2	Ergebnisse	33
2.1	Deletion des <i>Conductin</i> -Gens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen.....	33
2.2	Verlust von Conductin führt zu keinen offensichtlichen phänotypischen Veränderungen	36
2.3	Verlust eines <i>Axin</i> -Allels führt zu Holoprosenzephalie in <i>Cor^{lacZ/lacZ}</i> -Mäusen.....	37
2.4	Die initiale Kopfinduktion verläuft normal in <i>Cor^{lacZ/lacZ}; Ax^{Tg1/+}</i> -Mäusen	43
2.5	Fehlbildungen des Gehirns beschränken sich auf das Vorderhirn.....	44
2.6	Verlust der <i>Shh</i> -Expression in der anterioren entopedunkularen Zone von <i>Cor^{lacZ/lacZ}; Ax^{Tg1/+}</i> -Embryonen	48

2.7	Verlust eines zusätzlichen β -Catenin-Allels mildert die phänotypischen Veränderungen der $Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Tiere.....	51
2.8	Gleichzeitiger Verlust von beiden <i>Conductin</i> - und <i>Axin</i> -Allelen führt zum Absterben der Embryonen vor der Gastrulation.....	52
2.9	Analyse der <i>Conductin-lacZ</i> -Expression in intestinalen Adenomen <i>Apc</i> -mutierter Mäuse	54
3	Diskussion	55
3.1	Holoprosenzephalie in $Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Mäusen	55
3.2	Entstehung von Oligodendrozyten wird anscheinend durch ektopisches Wnt-Signal unterdrückt.....	58
3.3	Verlust eines β -Catenin-Allels vermindert HPE-Phänotyp.....	58
3.4	Der $Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Phänotyp unterscheidet sich von Defekten, die auf fehlerhafter Kopfinduktion beruhen	62
3.5	Die Funktion von Conductin in der frühen Embryogenese kann von Axin übernommen werden.....	64
3.6	In der frühen Embryonalentwicklung kann Conductin die Funktion von Axin übernehmen.....	64
3.7	Conductin als „Rettungsanker“ im Wnt-Signalweg.....	65
4	Material und Methoden.....	69
4.1	Mutagenese durch Polymerase-Kettenreaktion.....	69
4.2	Gentechnische Arbeiten in Bakterien.....	70
4.3	Kultur, Transfektion und Selektion von Zellen	70
4.4	Proteinextraktion aus Mausgewebe, Proteingelelektrophorese und Immunoblot („Western-Blot“)	71
4.5	Konstruktion der „targeting“-Vektoren	72

4.6	Etablierung neuer Mausstämme durch Blastozysten- injektion.....	75
4.7	Genotypisierungen	76
4.8	Embryoschnitte und -färbungen	77
4.9	Immunohistochemie.....	78
4.10	In situ Hybridisierung	78
4.11	TUNEL-Reaktion zum Apoptosenachweis.....	83
4.12	Material und Geräte	83
5	Literaturverzeichnis	85
	Anhang	104

Zusammenfassung

Die Signalübertragung durch Wnt/ β -Catenin stellt einen der wichtigsten Signalwege während der Embryogenese sowie im adulten Organismus dar. Aberrante Aktivierung des Signalwegs führt zur Entstehung von Tumoren. Dabei kommt einem zytoplasmatischen Multiproteinkomplex, welcher den kontinuierlichen proteosomalen Abbau und die dafür notwendige Phosphorylierung des zentralen Effektormoleküls β -Catenin gewährleistet, eine besondere Bedeutung zu. Die homologen Gerüstproteine Conductin und/oder Axin stehen im Mittelpunkt dieses Komplexes. In der vorliegenden Arbeit habe ich eine kombinierte genetische Analyse von Conductin und Axin in der Maus durchgeführt. Dazu habe ich zuerst mit Hilfe der Technik der homologen Rekombination das *Conductin*-Gen deletiert und gleichzeitig ein Reportergen unter die Kontrolle des endogenen *Conductin*-Promotors gebracht.

Ich habe festgestellt, dass der gemeinsame Verlust von *Conductin* und einem *Axin*-Allel (*Con*^{-/-}; *Ax*^{+/-}) zu schweren kraniofazialen und Vorderhirndefekten in der Maus führt. Ähnliche Missbildungen werden beim Menschen im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der Holoprosenzephalie (HPE) beobachtet. Die detaillierte Analyse der *Con*^{-/-}; *Ax*^{+/-}-Embryonen zeigte eine genetische Interaktion des Wnt-Signalwegs mit dem Shh-Signalweg. Störungen im Shh-Signalweg sind auch beim Menschen für die Ausbildung der HPE verantwortlich.

Zusätzlich wurde die Analyse auf die Untersuchung doppelt homozygot mutierter Embryonen ausgedehnt. Der Verlust von Axin alleine bewirkt eine Überaktivierung des Wnt-Signalwegs, die zur Ausbildung einer sekundären Körperachse führt. Die gleichzeitige Abwesenheit von Conductin und Axin (*Con*^{-/-}; *Ax*^{-/-}) bewirkt dagegen den Verlust der anterior-posterioren Achse und führt zum Absterben der Embryonen nach dem Tag 6,5 der Entwicklung.

Die vorliegende Arbeit zeigt, wie Unterschiede in der biologischen Bedeutung zweier funktionell redundanter Faktoren mit genetischen Methoden in der Maus aufgeklärt werden können.

1 Einleitung

Die Musterung des Embryos beziehungsweise spezifischer Strukturen, wie beispielsweise der Gliedmaßen und besonders auch des Zentralnervensystems (ZNS), sind grundlegende Vorgänge während der Embryogenese. Die dabei ablaufenden Prozesse sind evolutionär stark konserviert. Sie laufen im Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) und Zebrafisch (*Danio reio*) nahezu identisch zu Maus oder Mensch ab und sind auch in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* in ihren Grundlagen, wenn auch nicht in ihrer Komplexität, vergleichbar. Die interzelluläre Kommunikation, welche so entscheidende Prozesse wie Morphogenese, Proliferation und Differenzierung im Embryo reguliert, wird von etwa einem halben Dutzend grundlegender Signalwege – dem TGF β /BMP-, dem Rezeptor-Tyrosinkinase-, dem Kernrezeptor, dem Jak/STAT-, dem Notch- und nicht zuletzt dem Hedgehog- und dem Wnt-Signaltransduktionsweg – kontrolliert (Gerhart, 1999). Jeder dieser Signalwege wird wiederholt während der frühen Embryonalentwicklung, aber auch bei der Genese aller Organe verwendet. Dabei kommt dem Zusammenspiel sowie der Aktivierung und Repression der unterschiedlichen Signalwege eine entscheidende Rolle zu. Medizinisch haben die genannten Signalwege eine besondere Bedeutung erlangt, da die Deregulation jedes einzelnen im adulten Organismus zur Entstehung verschiedener Krankheiten wie zum Beispiel von Krebs führen kann (Hunter, 1997).

Der Wnt/Wingless-Signalweg ist in den letzten Jahren zu einem komplexen Netzwerk von Komponenten angewachsen, das verschiedene Prozesse in der Embryogenese in so unterschiedlichen Spezies wie dem Nematoden *C. elegans*, der Fruchtfliege *Drosophila*, aber auch in Vertebraten wie dem Frosch, der Maus und nicht zuletzt dem Menschen steuert. Dabei zeigt sich eine Zunahme der Komplexität von den einfacheren Lebensformen zu den Vertebraten, die in den Säugern ihren Höhepunkt erreicht. Hier erlangt der Wnt-Signalweg eine besondere Bedeutung, da zahlreiche Mutationen in verschiedenen Komponenten ursächlich für die Entstehung von Krebs verantwortlich sind. Im Mittelpunkt meiner Arbeit steht das Gerüstprotein Conductin, das zusammen mit seinem Homologen Axin diejenige Komponente des klassischen, kanonischen Wnt-Signalwegs darstellt, an der im Zusammenspiel mit weiteren Faktoren über das Schicksal des zytoplasmatischen Effektors β -Catenin entschieden

wird. Mit Hilfe der Technik der homologen Rekombination habe ich das *Conductin*-Gen in der Maus inaktiviert. Durch die Kreuzung von *Conductin*- und *Axin*-mutierten Tieren wurde die Funktion der beiden Gene *in vivo* bestimmt. Dabei zeigt sich eine überraschende genetische Interaktion des Wnt-Signalwegs mit der Shh-vermittelten Signalübertragung. Defekte in der Entwicklung des Vorderhirns und besonders des Telenzephalons bringen den Wnt-Signalweg in Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der Holoprosenzephalie.

1.1 Der Wnt-Signalweg

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das von uns erstmals beschriebene und charakterisierte Conductin (Behrens, Jerchow et al., 1998). Wie wir zeigen konnten, steht Conductin im Zentrum des kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Dieser soll im Folgenden im Detail vorgestellt werden.

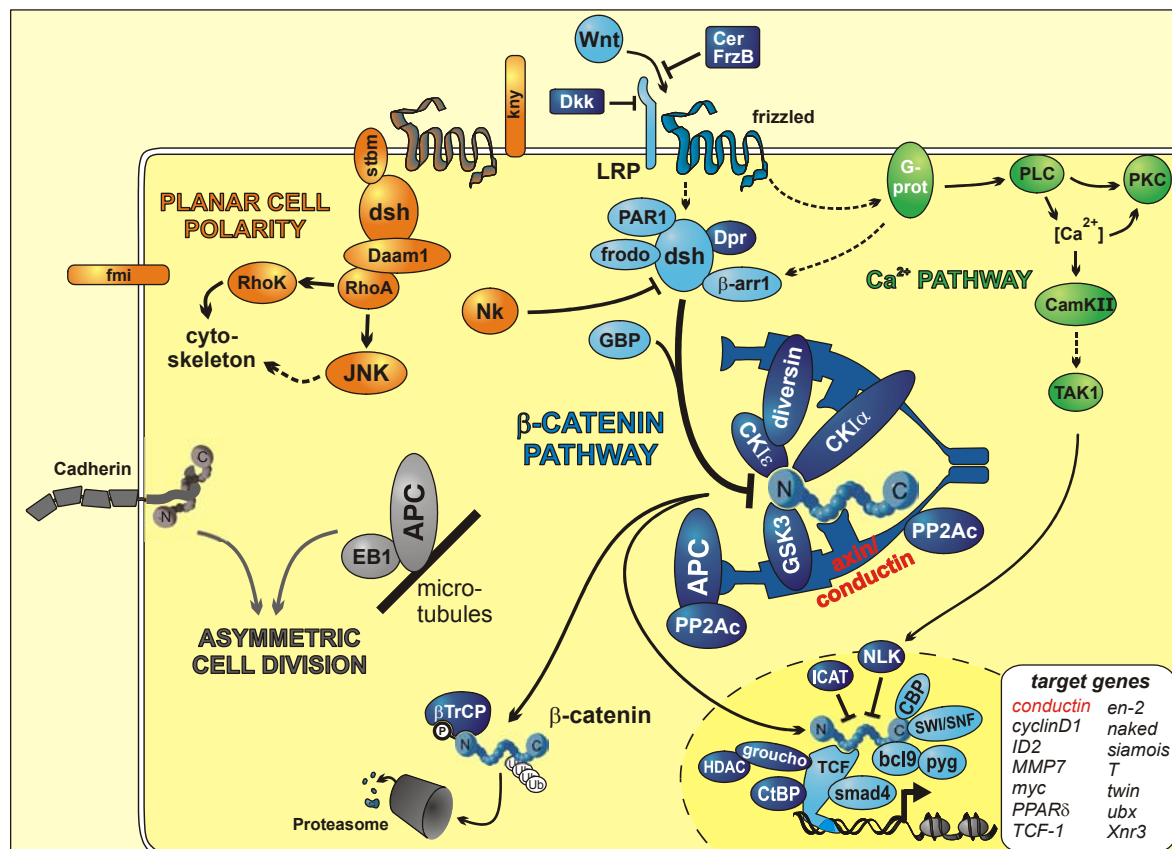


Abb. 1.1: Derzeitiges Modell der Wnt-induzierten Signalübertragung. Durch die Stimulation mit Wnt kann es zur Aktivierung dreier weitgehend unabhängiger Signalkaskaden kommen. Dabei unterscheidet man den die planare Polarität von Epithelzellen beeinflussenden (planar cell polarity, PCP) Signalweg (orange), den wahrscheinlich G-Protein-vermittelten Calcium-Signalweg (grün) und den klassischen über den Effektor β -Catenin verlaufenden kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg (blau). Die molekularen Komponenten und Regelmechanismen des kanonischen Wnt-Signalwegs sind im Text im Detail beschrieben. Schema zur Verfügung gestellt von J. Hülsken (Huelsken and Birchmeier, 2001).

Der zentrale Prozess, der dem kanonischen Wnt-Signalweg zugrunde liegt, ist die Regulation der Stabilität des Effektormoleküls β -Catenin. Aus diesem Grund wird er auch als β -Catenin-Signalweg bezeichnet. Ein extrazellulärer Wnt-Ligand setzt eine

Signalkaskade in Gang, die dazu führt, dass die N-terminale Phosphorylierung von β -Catenin inhibiert wird. Solange β -Catenin nicht phosphoryliert ist, reichert es sich in der Zelle an. Zusammen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren wandert es in den Kern und induziert dort die Transkription von Zielgenen des Wnt-Signalwegs.

Seit der Identifizierung des ersten Wnt-Liganden (Wnt1; Nusse and Varmus, 1982; van Ooyen and Nusse, 1984), wurden eine Reihe weiterer Homologe identifiziert. So kennt man inzwischen 19 unterschiedliche humane und murine *Wnt*-Gene, von denen die meisten auch in anderen Vertebraten konserviert sind. In *Drosophila* wurden bislang sieben *Wnt*-Gene beschrieben. Hierbei unterscheidet man transformierende *Wnt*-Gene, die vorzugsweise den klassischen Wnt-Signalweg aktivieren und nicht-transformierende *Wnt*-Gene, die im Allgemeinen den PCP- oder Calcium-Signalweg aktivieren (Abb. 1.1 und Kuhl et al., 2000).

Wnt-Liganden binden Frizzled-Rezeptoren an der Zelloberfläche (Bhanot et al., 1996). In der Maus kodieren mindestens zehn *Frizzled*-Gene für Proteine, die extrazellulär eine Cystein-reiche Domäne (CRD) besitzen, welche als Bindungsstelle für Wnt-Proteine dient. Frizzled-Proteine besitzen sieben Transmembrandomänen und ähneln damit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Tatsächlich stimulieren einige nicht-transformierende Wnt-Liganden über spezifische Frizzled-Rezeptoren den Calcium-Signalweg, und diese Stimulation verläuft über die Aktivierung heterotrimerer G-Proteine (Slusarski et al., 1997; Winklbauer et al., 2001). Zur Übertragung des Wnt-Signals in die Zelle muss ein ternärer Komplex aus Transmembranproteinen, die dem LDL-Rezeptor verwandt sind (LRP5 oder LRP6, *Drosophila* Arrow), Frizzled und Wnt gebildet werden (Tamai et al., 2000).

Die erste Stufe der Regulation stellen sezernierte Faktoren dar, die das Wnt-Signal inhibieren können. So besitzen Frizzled-verwandte Proteine (Frizzled related protein, Frp) eine CRD und kompetieren damit mit Frizzled-Rezeptoren um Wnt-Liganden (Rattner et al., 1997). *Xenopus* Cerberus (Maus Cerberus-like, Cer-I) besitzt eine Bindungsstelle für Wnt und wurde als multifunktionaler Antagonist des Nodal-, BMP- und Wnt-Signalwegs beschrieben (Piccolo et al., 1999). Als weitere Wnt-Inhibitoren wurden Dickkopf-Proteine charakterisiert (Glinka et al., 1998; Fedi et al., 1999), welche die Bindung von Wnt an LRP verhindern (Bafico et al., 2001; Semenov et al.,

2001; Bafico et al., 2001; Mao et al., 2001). Dadurch wird die Bildung des trimeren Komplexes zwischen Wnt, LRP und Frizzled gestört, die für die Übertragung des Wnt-Signals notwendig ist.

Intrazellulär wird das Wnt-Signal zunächst über Dishevelled (Dsh, Maus Dvl1-3) weitergeleitet (Klingensmith et al., 1994; Noordermeer et al., 1994; Sussman et al., 1994). Während die Funktionsweise von Dishevelled in Bezug auf Frizzled nach wie vor unklar bleibt, hat sich gezeigt, dass das Protein mit einer Reihe weiterer Faktoren interagiert. In *Drosophila* wird dsh von PAR-1 phosphoryliert; dies bewirkt bei gleichzeitiger Inhibition des PCP-Signalwegs eine Aktivierung des klassischen Wnt-Signalwegs (Sun et al., 2001). Auch Frodo und β -Arrestin1 (β -Arr1) binden an Dishevelled und wirken synergistisch im klassischen Wnt-Signalweg. β -Arr1 ist mit Signalen in Verbindung gebracht worden, die durch G-Proteine übertragen werden und verknüpft so möglicherweise den β -Catenin-Signalweg mit dem Calcium-Signalweg. Weitere Interaktionspartner von Dishevelled sind Dapper und *Drosophila* naked. Beide Proteine stellen negative Regulatoren des Wnt-Signalwegs dar (Cheyette et al., 2002; Rousset et al., 2001; Zeng et al., 2000).

Die zentrale Schaltstelle des Wnt-Signalwegs ist ein Multiproteinkomplex, in dem β -Catenin phosphoryliert und damit für den Abbau markiert wird. Der Komplex wird zusammengehalten durch Conductin und/oder Axin. In ihrer Funktion als Interaktionsplattform, die eine Reihe unterschiedlicher, für die Phosphorylierung von β -Catenin notwendiger Faktoren in räumliche Nähe zueinander bringt, können Conductin und Axin als Multiadapter- oder Gerüstproteine (engl. multi adaptor/scaffolding-protein) bezeichnet werden. Die Homologen Conductin und Axin sind zu 45% identisch, wobei sich innerhalb konservierter Domänen eine wesentlich stärkere Identität zeigt (Abb. 1.2).

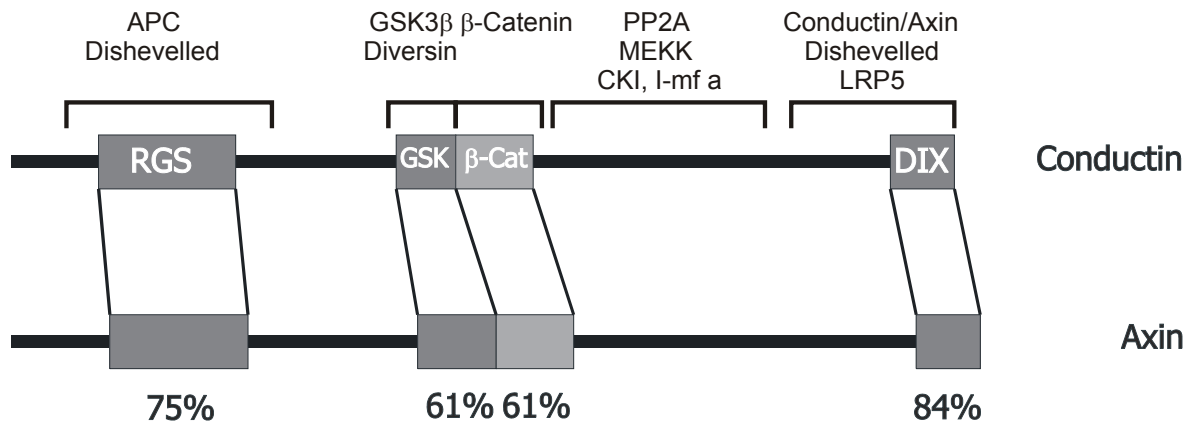


Abb. 1.2: Schematische Darstellung von Conductin und Axin. Die beiden Proteine sind zu 45% identisch. Prozentwerte markieren größere Identitäten innerhalb der homologen Bindungsdomänen. Klammern grenzen bekannte Bindungsstellen für die angegebenen Interaktionspartner ein. Eine detaillierte Beschreibung der unterschiedlichen Interaktionen findet sich im Text.

Conductin wurde in unserem Labor von J. Behrens in einem Hefe-2-Hybrid-Screen als Interaktionspartner von β -Catenin identifiziert und von mir im Rahmen meiner Diplomarbeit kloniert (Behrens, Jerchow et al., 1998). Wie wir erstmals zeigen konnten, bindet Conductin neben β -Catenin die Serin/Threonin-Kinase Glykogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β , *Drosophila* zeste white 3/shaggy) und das Tumorsuppressorgenprodukt APC (Abb. 1.2). Funktionelle Untersuchungen ergaben, dass es sich bei Conductin um einen negativen Regulator des Wnt-Signalwegs handelt: Überexpression von Conductin in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 induziert den Abbau von stabilisiertem β -Catenin; im Frosch kann durch Injektion von *Conductin*-mRNA die Ausbildung der primären Körperachse inhibiert werden oder die durch Injektion von *Xwnt8*-mRNA hervorgerufene Ausbildung einer sekundären Körperachse unterdrückt werden (Behrens, Jerchow et al., 1998).

Untersuchungen verschiedener Labore konnten weitere Bindungspartner von Conductin und Axin identifizieren. So bindet Axin genauso wie Conductin an β -Catenin, GSK3 β und APC (Ikeda et al., 1998; Kishida et al., 1998; Hart et al., 1998). Darüber hinaus ist die Interaktion der Gerüstproteine mit einer großen Zahl weiterer Faktoren beschrieben worden: Das zytoplasmatische Protein Diversin wurde in unserem Labor identifiziert und als Bindungspartner von Conductin charakterisiert (Schwarz-Romond et al., 2002). Des Weiteren wurde in unserer Arbeitsgruppe die

Bindung von I-mf a an Conductin beobachtet (Asbrand, 2002). Wie die Ergebnisse anderer Labore ergeben haben binden Conductin und/oder Axin außerdem an Casein Kinase I α (CKI α ; Liu et al., 2002), Protein Phosphatase 2A (PP2A; Hsu et al., 1999), LRP5 (Mao et al., 2001), LRP6 (J. Behrens, persönliche Mitteilung) und Dishevelled; die DIX-Domäne vermittelt eine Di- oder Oligomerisierung von Conductin und/oder Axin (Hedgepeth et al., 1999; Sakanaka and Williams, 1999).

Aus den vorgenannten Daten ergibt sich folgendes Modell zur Funktion des β -Catenin-Abbaukomplexes (zentraler Komplex in Abb. 1.1): Conductin und/oder Axin bilden über die DIX-Domäne Di- oder Oligomere, die an β -Catenin binden. Die Dimerisierung erlaubt die gleichzeitige Interaktion mit GSK3 β und Diversin, deren Interaktionen mit einem einzelnen Molekül sich gegenseitig ausschließen (Schwarz-Romond et al., 2002). Diversin rekrutiert seinerseits CKI ϵ . Somit werden zwei für den Abbau von β -Catenin essentielle Kinasen in direkte räumliche Nähe zu ihrem Zielmolekül gebracht. Durch eine zusätzliche Bindungsdomäne können die Gerüstproteine anscheinend CKI α auch direkt in den Komplex bringen (Liu et al., 2002). Durch seine Bindung an die RGS-Domäne von Conductin/Axin vervollständigt das Tumorsuppressorgenprodukt APC den Komplex, der den Abbau von β -Catenin induziert (Behrens, 2000; von Kries et al., 2000). β -Catenin besitzt in seinem N-Terminus regulatorische Sequenzen, deren Phosphorylierung einen effizienten Abbau des Proteins gewährleisten. Dabei kommt es zunächst zu einer so genannten „Priming“-Phosphorylierung innerhalb dieses regulatorischen Bereichs: CKI ϵ und/oder CKI α katalysieren die Übertragung einer Phosphatgruppe an Serin⁴⁵ von β -Catenin (Amit et al., 2002; Liu et al., 2002). Diese Modifikation erlaubt es GSK3 β drei weitere Aminosäuren, Threonin⁴¹, Serin³⁷ und Serin³³ im Aminoterminus von β -Catenin zu phosphorylieren. Wie verschiedene Untersuchungen gezeigt haben, stellt APC dabei einen essentiellen Kofaktor dar, ohne den die Phosphorylierung von β -Catenin beeinträchtigt ist. Sind die regulatorischen Sequenzen entsprechend phosphoryliert, wird β -Catenin vom F-Box-Protein β -TrCP (*Drosophila* Slimb; Hart et al., 1999; Jiang and Struhl, 1998) erkannt. Dieses vermittelt dann die Ubiquitylierung von β -Catenin, die in der Folge zum raschen Abbau des Proteins im Proteasom führt (Aberle et al., 1997).

In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass zur Funktion von CKI ϵ zurzeit noch widersprüchliche Daten existieren: Es ist gezeigt worden, dass CKI ϵ an Dishevelled bindet und dieses phosphorylieren kann. Dabei wurde CKI ϵ als positiver Regulator des Wnt-Signalwegs beschrieben (Peters et al., 1999; Sakanaka et al., 1999). Wie die Phosphorylierung von Dishevelled zur Aktivierung des Signalwegs führt bleibt jedoch unklar. Dagegen zeigen Daten aus unserem Labor, dass CKI ϵ über Diversin und Conductin/Axin in die Nähe von β -Catenin gebracht wird. In diesem Zusammenhang ist CKI ϵ für die Phosphorylierung und den anschließenden Abbau von β -Catenin notwendig (Schwarz-Romond et al., 2002). Auch andere Labore identifizieren CKI α und CKI ϵ als negative Regulatoren des Wnt-Signalwegs (Liu et al., 2002; Rubinfeld et al., 2001). Es bleibt allerdings unklar, ob die Kinasen direkt mit Axin interagieren können.

1.2 Inaktivierung des Abbaukomplexes

In der Anwesenheit von Wnt-Liganden kommt es über die Rezeptoren Frizzled und LRP und über das zytoplasmatische Protein Dishevelled zur Inaktivierung des β -Catenin-Abbaukomplexes bzw. zur Inhibition der Phosphorylierungsreaktionen am Aminoterminal von β -Catenin. Die mechanistischen Vorgänge, die diesem Prozess zugrunde liegen, bleiben bisher weitgehend im Dunkeln. Aufgeklärt sind lediglich die folgenden Zusammenhänge: *In vitro* ist β -Catenin ein schlechtes Substrat für GSK3 β . Erst die Zugabe von Axin ermöglicht eine effiziente Phosphorylierung von β -Catenin durch GSK3 β (Ikeda et al., 1998; Hart et al., 1998; Willert et al., 1999). Axin und APC sind selbst Substrate von GSK3 β (Willert et al., 1999; Rubinfeld et al., 1996). Im phosphorylierten Zustand verstärkt sich ihre Bindung an β -Catenin. Es ist gezeigt worden, dass PP2A mit Axin interagiert und dass das Wnt-Signal die Dephosphorylierung von Axin durch PP2A stimuliert (Willert et al., 1999; Strovel et al., 2000). Die Dephosphorylierung von Axin und möglicherweise auch von Conductin als Antwort auf das Wnt-Signal ist aller Wahrscheinlichkeit nach ein Teilaspekt der Inaktivierung des Multiproteinkomplexes, der den Abbau von β -Catenin induziert. Über welche Zwischenschritte die Phosphatase durch Wnt stimuliert wird und welche weiteren Modifikationen am Komplex stattfinden müssen, um die Phosphorylierung von β -Catenin zu unterdrücken, bleibt jedoch weiterhin unklar.

1.3 Aktivierung von Zielgenen des kanonischen Wnt-Signalwegs

Alle Signalkaskaden, die eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung spielen, antworten auf extrazelluläre Signale und aktivieren dann die Transkription spezifischer Zielgene im Zellkern. Die dabei verwendeten Transkriptionsfaktoren binden an definierte Sequenzen im Genom und sind in ihrer Aktivität der Kontrolle durch den Signalweg unterworfen (Übersicht bei Barolo and Posakony, 2002). Im kanonischen Wnt-Signalweg übernehmen Proteine aus der LEF/TCF-Familie die Rolle der signalregulierten Transkriptionsfaktoren (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996). Alle Mitglieder der LEF/TCF-Familie zeichnen sich durch das Vorhandensein einer so genannten High Mobility Group (HMG)-Box aus, die sequenzspezifische Bindungen an das Genom vermittelt. Daneben besitzen sie eine aminoterminalen β -Catenin-Bindungsdomäne.

In der Abwesenheit von β -Catenin reprimieren LEF/TCF-Faktoren zusammen mit den Korepressoren CtBP (Brannon et al., 1999) und/oder Groucho (Cavallo et al., 1998) die Expression von Wnt-Zielgenen. Dabei scheint die Repression durch Groucho über dessen Bindung an Histon-Deacetylasen (HDAC) vermittelt zu werden (Chen et al., 1999b). Die Stimulation des Wnt-Signalwegs führt wie beschrieben zur Stabilisierung von β -Catenin. Dieses wandert in den Zellkern ein, bildet dort einen Komplex mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren und den Koaktivatoren CBP/P300 (Histon-Acetylasen; Hecht et al., 2000; Takemaru and Moon, 2000) und Pygopus (Belenkaya et al., 2002; Greaves, 2002; Kramps et al., 2002; Parker et al., 2002), welches über legless/BCL9 (Kramps et al., 2002) an β -Catenin bindet und aktiviert dadurch die Transkription der selben Wnt-Zielgene, die zuvor durch die LEF/TCF-Korepressor-Komplexe reprimiert wurden (Nusse, 1999). Verschiedene Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren zahlreiche Zielgene des Wnt-Signalwegs identifiziert. Wie wir zeigen konnten gehört auch *Conductin* selbst zu diesen Genen (vergl. Kapitel 2.8 und Lustig, Jerchow et al., 2002; eine umfassende und regelmäßig ergänzte Liste aller bekannten Wnt-Zielgene findet sich bei Nusse, 2002).

Den beschriebenen Mechanismen der Zielgenaktivierung können zwei Proteine entgegenwirken, deren Aktivität anscheinend unabhängig vom kanonischen Wnt-Signalweg reguliert wird. So ist ICAT als Faktor beschrieben worden, der an β -

Catenin bindet und damit dessen Interaktion mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren verhindert (Tago et al., 2000). Daneben wird NLK möglicherweise durch den Calcium-Signalweg via TAK1 durch Phosphorylierung aktiviert, um dann ebenfalls der Bindung von β -Catenin an die Transkriptionsfaktoren entgegenzuwirken (Ishitani et al., 1999).

Zusammenfassend zeigt sich, dass der Wnt-Signalweg auch in seinem letzten Schritt, der Aktivierung von Zielgenen, durch ein komplexes Netzwerk aus Aktivatoren und Repressoren straff reguliert wird. Dabei wird die Transkription spezifischer Zielgene abhängig vom Kontext wahrscheinlich noch durch weitere Faktoren beeinflusst. So bindet beispielsweise Smad4, welches zuvor als Signalkomponente des Bmp/Nodal-Signalwegs beschrieben wurde, an LEF/TCF und könnte dadurch bewirken, dass nur bestimmte Untergruppen von Zielgenen aktiviert werden (Nishita et al., 2000). In ähnlicher Weise könnten weitere, bislang unbekannte Faktoren die Spezifität der LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren so modulieren, dass andere Untergruppen von Zielgenen transkribiert werden.

1.4 Der Wnt-Signalweg in der Tumorentstehung

Wie zahlreiche Beispiele zeigen, kann die konstitutive Aktivierung des Wnt-Signalwegs zur Entstehung von Krebs führen. So wurde Wnt1 selbst erstmals unter dem Namen Int-1 als Onkogen beschrieben (Nusse et al., 1984; Nusse and Varmus, 1982; van Ooyen and Nusse, 1984). Mechanistisch liegt der onkogenen Aktivierung des Signalwegs immer eine konstitutive Stabilisierung von freiem β -Catenin zugrunde. Dies wird in den meisten Fällen dadurch erreicht, dass eine Komponente des β -Catenin-Abbaukomplexes mutiert ist. Häufig liegen auch Mutationen in den regulatorischen Sequenzen von β -Catenin selbst vor. In beiden Fällen bewirken die Mutationen, dass β -Catenin nicht phosphoryliert wird. Dadurch wird es nicht durch β -TrCP erkannt, also auch nicht ubiquitinyliert und abgebaut und reichert sich in der Zelle an. Freies β -Catenin geht dann wie weiter oben beschrieben in den Zellkern und aktiviert zusammen mit LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren Wnt-Zielgene.

APC stellt den Prototypen eines Tumorsuppressorgens dar, dessen Mutation den Wnt-Signalweg mit der Entstehung von Darmkrebs in Verbindung gebracht hat. So wurden sowohl bei der erblichen familiären adenomatösen Polyposie (FAP), als auch

bei rund 80% aller spontanen Darmkrebsfälle, Mutationen im *APC*-Gen, gefolgt von einem Verlust des wildtypischen *APC*-Allels (loss of heterozygosity, LOH), identifiziert (Kinzler et al., 1991; Miyaki et al., 1994; Miyoshi et al., 1992; Nagase and Nakamura, 1993). Sämtliche bislang in Verbindung mit Krebsfällen identifizierte *APC*-Mutationen führen zu verkürzten Transkripten und stehen im Zusammenhang mit einer Stabilisierung von freiem β -Catenin (Munemitsu et al., 1995; Rubinfeld et al., 1996). Interessanterweise kodieren die verkürzten Transkripte alle für ein APC-Protein, welchem die drei von uns beschriebenen Conductin-Bindungsstellen (SAMP-Repeats; Behrens et al., 1998) fehlen. Es ist gezeigt worden, dass ein verkürztes APC-Protein, welches kein SAMP-Repeat mehr besitzt, nicht in der Lage ist, den Abbau von β -Catenin *in vitro* zu induzieren (von Kries et al., 2000; Kawahara et al., 2000). Die Bedeutung der Interaktion von APC mit Conductin/Axin wird auch durch den Vergleich der Maus-Modelle *Apc*^{1638T} und *Apc*^{Min} deutlich: Das mutierte Allel *Apc*^{1638T} kodiert für ein APC-Protein, welches noch ein SAMP-Repeat besitzt; es entstehen keine Tumore (Smits et al., 1999). Dagegen entwickeln sich in der *Apc*^{Min}-Maus, bei der alle SAMP-Repeats deletiert sind, binnen weniger Monate zahlreiche Adenome im Darm (daher der Name MIN für Multiple Intestinal Neoplasias; Moser et al., 1995a; Su et al., 1992). Zusammengenommen führte dies zu dem Modell, dass APC in dem von Conductin/Axin vermittelten Komplex ein essentieller Kofaktor für den Abbau von β -Catenin ist, wobei der genaue Wirkungsmechanismus weiter unklar bleibt.

Wie oben ausgeführt werden rund 80% aller Darmkrebsfälle durch Mutationen in *APC* verursacht. Ein Grossteil der übrigen Fälle ist auf Mutationen in *β -Catenin* selbst zurückzuführen. Dabei betreffen die Mutationen in den meisten Fällen die regulatorischen Sequenzen im N-Terminus des Proteins, die für eine Phosphorylierung durch CKI oder GSK3 β notwendig sind. Fehlen die entsprechenden phosphorylierten Reste, so kann β -Catenin von β -TrCP nicht mehr erkannt werden. Analog zu *APC*-Mutationen führt dies zu einer Stabilisierung des zytoplasmatischen β -Catenin-Pools und einer daraus folgenden konstitutiven Aktivierung von Wnt-Zielgenen (Morin, 1999; Morin et al., 1997; Rubinfeld et al., 1997; Behrens, 1999; Polakis, 2000; Wong et al., 2001).

Neben APC stellen Conductin und Axin weitere potentielle Tumorsuppressoren im Wnt-Signalweg dar. Tatsächlich konnten *Axin*-Mutationen als Ursache mehrerer Fälle

von Darm- und Leberkrebs sowie in Medulloblastomen identifiziert werden. Die Stabilisierung von β -Catenin wird dabei meist durch Veränderungen verursacht, die die β -Catenin- oder GSK3 β -Bindungsstelle des Axin-Proteins betreffen (Shimizu et al., 2002; Webster et al., 2000; Satoh et al., 2000; Buendia, 2000; Yokota et al., 2002). Außerdem wurden Mutationen beschrieben, die zum vollständigen Verlust von Axin führen und solche, die die Deletion weiterer Bereiche des Amino- oder Carboxyterminus von Axin verursachen. Dabei wird den Restproteinen eine dominant-negative Wirkung zugesprochen (Dahmen et al., 2001). *Conductin*-Mutationen wurden bislang nur in kolorektalen Tumoren mit Defekten in einem DNA-Reparatursystem, welches den Einbau falscher Basen in neu entstandene DNA-Stränge korrigiert (mismatch-repair, MMR), identifiziert. Dabei kommt es in den beschriebenen Fällen zur Synthese eines verkürzten Conductin-Proteins, welchem die DIX-Domäne fehlt und das durch einen dominant-negativen Mechanismus zur Stabilisierung von β -Catenin führt (Liu et al., 2000).

1.5 Der Wnt-Signalweg in der Embryogenese

Der Wnt-Signalweg zeigt sich evolutionär stark konserviert. Neben den Vertebraten hat sich seine essentielle Funktion in embryonalen Musterbildungsprozessen auch in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* gezeigt. Kürzlich wurden auch eine Reihe von Komponenten des Wnt-Signalwegs im Süßwasserpolypen *Hydra* identifiziert (Hobmayer et al., 2000).

In der frühen Embryogenese der Vertebraten ist der Wnt-Signalweg notwendig, um die anterior-posteriore Achse zu etablieren. Der Verlust des Wnt-Effektors β -Catenin führt dazu, dass der Embryo keine Achse ausbildet. Anteriore Markergene bleiben distal exprimiert. In der Folge werden keine Kopf- oder mesodermalen Strukturen ausgebildet (Huelsenken et al., 2000). In *Xenopus* und dem Zebrafisch ist die anteriore Anreicherung von β -Catenin auf der dorsalen Seite des Embryos der erste Hinweis auf die sich bildende Körperachse (Schneider et al., 1996; Larabell et al., 1997). Die Funktion zahlreicher Komponenten des Wnt-Signalwegs wurden durch Injektion von mRNA in frühe *Xenopus*-Embryonen untersucht: Die dorsale Injektion von antagonistisch wirkenden Signalwegkomponenten verhindert die Ausbildung der anterior-posterioren Achse. Dies steht in Analogie zu den Beobachtungen in der

Maus, in der die Signalübertragung durch β -Catenin offensichtlich essentiell für die Genese anteriorer und posteriorer Identität ist. Folgerichtig verursacht die ventrale Injektion von Komponenten des Wnt-Signalwegs, die eine Stimulation des Signalwegs bewirken, in *Xenopus* die Entstehung einer sekundären Körperachse (Abb. 1.3; Übersicht bei Moon and Kimelman, 1998; Solnica-Krezel, 1999). Ähnliche Effekte zeigen sich in der Maus. So bewirkt der Verlust von Axin eine Stabilisierung von β -Catenin, die ihrerseits zur Induktion einer sekundären Körperachse führt (Zeng et al., 1997).

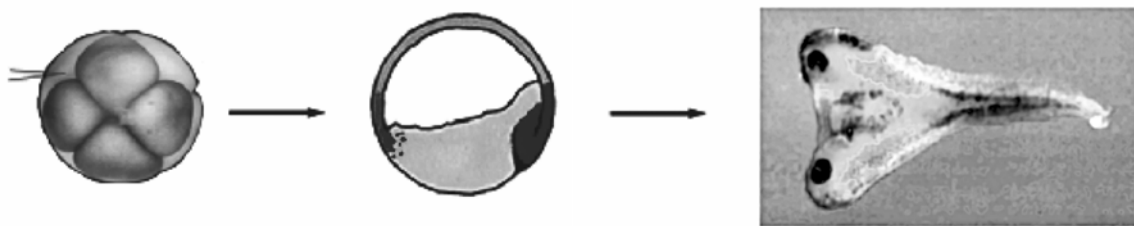


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der mRNA-Injektion in *Xenopus*-Embryonen. Wird *Xenopus*-Embryonen im Vierzellstadium ventral mRNA von Faktoren injiziert, welche den Wnt-Signalweg stimulieren, so kommt es zunächst zur Bildung eines zweiten dorsalen Signalzentrums (dorsal organizer), das dann die Ausbildung eines sekundären Rumpfes mitsamt des Kopfes steuert.

Nachdem die anterior-posteriore Achse eingerichtet und erstes Mesoderm ausgebildet wurde, bekommt der Wnt-Signalweg eine Funktion in der Spezifikation posteriorer Identität. Bei der Gastrulation schiebt sich die Prächordalplatte unter das Ektoderm. Während das Ektoderm Wnt- und Bmp-Signalmoleküle exprimiert, sezerniert die Prächordalplatte Moleküle, die als extrazelluläre Antagonisten der beiden Signalwege wirken. Die Inhibition von Wnt durch FrzB, Dkk und Cerberus ist dabei für die Ausbildung anteriorer Identität und damit für die Induktion des Kopfes zwingend erforderlich (Übersicht bei Niehrs, 1999). So führt die Überexpression von Dkk1 in Verbindung mit dominant-negativem Bmp-Rezeptor in *Xenopus* zur Induktion eines zweiten Kopfes (Glinka et al., 1998), während die Abwesenheit von Dkk1 in der Maus den Verlust anteriorer Strukturen bewirkt (Mukhopadhyay et al., 2001). Die Musterung des Zentralnervensystems wird in der weiteren Entwicklung durch den Aufbau eines in kaudale Richtung zunehmenden Gradienten der Expression verschiedener Wnt-Liganden erreicht. Dabei unterliegen Wnt- und Bmp-Liganden

einer fein regulierten Wechselwirkung mit Antagonisten, die in der Prächordalplatte bzw. der Prächordalplatte und dem Chordamesoderm exprimiert werden.

Wie klassische und gewebsspezifische Geninaktivierungsexperimente in der Maus in den letzten Jahren gezeigt haben, behält der Wnt-Signalweg während der gesamten Embryogenese in den verschiedensten Geweben seine herausragende Bedeutung. So kommt es beispielsweise bei der Inaktivierung von Wnt1 zum Verlust des Mittelhirns und des Cerebellums (Mastick et al., 1996; McMahon and Bradley, 1990; McMahon et al., 1992; Thomas and Capecchi, 1990; Thomas et al., 1991). Wnt7a-mutierte Tiere weisen Defekte in der Reifung von Synapsen im Cerebellum auf (Hall et al., 2000). Auch ein dominant-negatives *LEF1*-Allel verursacht Störungen in der Gehirnentwicklung, die zum Fehlen des Hippocampus führen (Galceran et al., 2000). Weitere Gewebe, an deren Entwicklung der Wnt-Signalweg beteiligt ist, sind neben dem Gehirn beispielsweise die Niere (Stark et al., 1994), die Gliedmaßen (Parr and McMahon, 1995), die Haut (Huelsen et al., 2001) und die Lunge (Shu et al., 2002).

1.6 Der Hedgehog-Signalweg

Bei meiner Analyse der Conductin und Axin-Funktion während der Embryogenese, konnte ich die genetische Interaktion des Wnt-Signalwegs mit dem Sonic Hedgehog-Signalweg beobachten. Aus diesem Grund soll dieser während Embryo- und Organogenese besonders wichtige Signalweg im Folgenden näher vorgestellt werden. Seit der Entdeckung des *Drosophila*-Homologen Hedgehog (Hh; Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980) hat sich eine große Zahl von Veröffentlichungen mit der Identifizierung und Funktion von Komponenten des Hh-Signalwegs befasst. Viele der Studien wurden in *Drosophila*, eine große Zahl jedoch auch in Zellkultursystemen und Vertebraten durchgeführt. Dank dieser Untersuchungen ist unser heutiges Modell dieses Signalwegs entstanden, der neben dem Wnt-Signalweg wohl einen der wichtigsten und komplexesten Signaltransduktionsprozesse in der Embryonalentwicklung von der Fruchtfliege bis hin zum Menschen darstellt (für eine umfassende Übersicht siehe Ingham and McMahon, 2001).

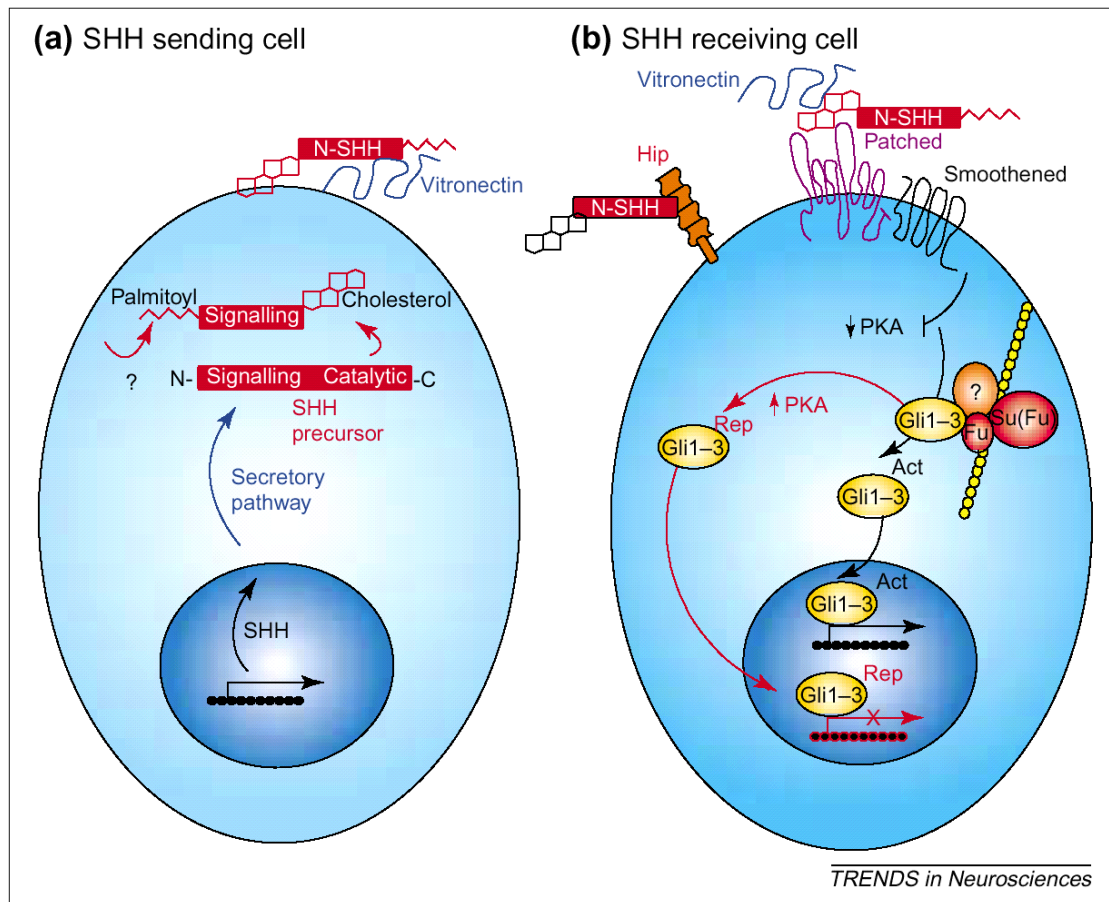


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des Shh-Signalwegs. Die dargestellten molekularen Komponenten und Regelmechanismen sind im Text im Detail beschrieben (Schema entnommen aus Marti and Bovolenta, 2002)

Abbildung 1.4 zeigt schematisch die molekularen Komponenten und Prozesse, die dem Hh-Signalweg zugrunde liegen. In der Abwesenheit von Hh-Liganden inhibiert der Hh-Rezeptor Patched (Ptc) das zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehörende Membranprotein Smoothened (Smo), welches interessanterweise große Ähnlichkeit zu den Wnt-Rezeptoren aus der Frizzled-Familie aufweist (Nakano et al., 1989; Alcedo et al., 1996; Chen and Struhl, 1996; Stone et al., 1996; Chen and Struhl, 1998; Murone et al., 1999; Hooper and Scott, 1989). Weder der durch Ptc vermittelte Inhibitionsmechanismus, noch die Frage, ob die Signalübertragung durch Smo tatsächlich über G-Proteine vermittelt wird, konnten bisher eindeutig geklärt werden. Es wird jedoch ein katalytischer Mechanismus vorgeschlagen, der die Inhibition von Smo durch Ptc vermittelt (Taipale et al., 2002; verschiedene mögliche Mechanismen werden bei Nybakken and Perrimon, 2002

diskutiert). In Säugern stellen drei homologe Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren, Gli1-3 (*Drosophila* Cubitus interruptus, Ci; Orenic et al., 1990; Kinzler et al., 1987; Hui et al., 1994; Walterhouse et al., 1993; Ruppert et al., 1990; Kinzler and Vogelstein, 1990; Ruppert et al., 1988; Kinzler et al., 1988), diejenigen Komponenten dar, durch die das Hh-Signal interpretiert wird. Dabei wirken Gli1 und 2 in der Regel als Aktivatoren, während Gli3 meist als Repressor von Hh-spezifischen Zielgenen wirkt (Altaba, 1998; Aza-Blanc et al., 2000; von Mering and Basler, 1999). *Gli1* und *Gli3* stellen selbst Zielgene des Hh-Signalwegs dar, wobei die *Gli1*-Expression durch den Signalweg stimuliert und die *Gli3*-Expression unterdrückt wird (Lee et al., 1997; Marigo et al., 1996a). Solange Smo durch Ptc inhibiert wird, werden die Gli-Proteine durch Protein Kinase A (PKA) phosphoryliert (Chen et al., 1999a; Price and Kalderon, 1999; Wang et al., 1999). Analog zum Wnt-Signalweg werden Ci/Gli-Proteine außerdem durch GSK3 β und CKI phosphoryliert (Jia et al., 2002; Price and Kalderon, 2002). In *Drosophila* wird das phosphorylierte Gli-Homologe Ci über seine Bindung an Costal2 (Cos2; Forbes et al., 1993) an Mikrotubuli verankert (Robbins et al., 1997; Wang et al., 2000). Obwohl Vertebraten kein Cos2-Homolog besitzen, wird eine Assoziation der Ci-Homologen Gli1-3 mit Mikrotubuli diskutiert, die jedoch bislang nicht nachgewiesen werden konnte (Ruiz et al., 2002; Marti and Bovolenta, 2002). Phosphoryliertes Gli2 und Gli3 wird proteolytisch gespalten. Aus der Spaltung gehen aminoterminal Fragmente hervor, die die Expression von Hh-Zielgenen unterdrücken können (Altaba, 1999; Dai et al., 1999; Karlstrom et al., 1999; Sasaki et al., 1999). Bemerkenswert ist, dass das phosphorylierte *Drosophila*-Homologe Ci genauso wie Arm durch Slimberkannt und der Spaltung im Proteasom zugeführt wird (die durch den SCF^{Slimb}-Komplex vermittelte Prozessierung von Ci wird bei Jiang, 2002 im Detail diskutiert). Ob Gli-Proteine auch wie β -Catenin von β -TrCP gebunden werden, ist dagegen unbekannt. Posttranslationale Modifikationen von Gli1 wurden bisher nicht beschrieben. Eine weitere Ebene der negativen Regulation erfährt der Signalweg durch die Bindung von Suppressor of Fused (Su[Fu]) an Ci/Gli-Transkriptionsfaktoren. Dabei wirkt Su(Fu) anscheinend als transkriptioneller Korepressor, indem es über seine Bindung an SAP18 Histon-Deacetylasen rekrutiert (Pearse et al., 1999; Cheng and Bishop, 2002).

Mensch und Maus besitzen die drei Hh-Proteine, Sonic, Indian und Desert Hedgehog (Shh, Ihh, Dhh; Echelard et al., 1993). Während der Embryogenese synthetisieren Zellen verschiedener Signalzentren zu spezifischen Zeiten Hh-Vorläuferproteine (Bumcrot et al., 1995; Lee et al., 1994). Das Vorläufer-Protein erfährt zunächst eine durch den eigenen C-Terminus katalysierte, über ein Thioester-Intermediat verlaufende autoproteolytische Spaltung. Dabei unterliegt das Intermediat einem nukleophilen Angriff durch Cholesterin, aus dem das N-terminale Fragment mit einem carboxyterminal kovalent verknüpften Cholesterin-Rest als signalaktiver Hh-Ligand hervorgeht (Porter et al., 1996). Zusätzlich vermittelt die Acetyltransferase sightless (sit, auch bekannt unter den Namen skinny hedgehog [ski], rasp und central missing [cmn]) die Palmitoylierung des ersten Cysteinrests am Aminoterminus des Hh-Liganden (Pepinsky et al., 1998; Amanai and Jiang, 2001; Chamoun et al., 2001; Lee and Treisman, 2001; Micchelli et al., 2002). Die Funktion der N- und C-terminalen Fettsäure- bzw. Sterolmodifikationen bleibt nach wie vor weitgehend unklar. So ist zwar von einer reduzierten Signalaktivität unmodifizierter Liganden berichtet worden (Pepinsky et al., 1998; Chamoun et al., 2001; Lee and Treisman, 2001). Den Modifikationen ist jedoch auch eine mögliche Rolle beim interzellulären Transport und bei der Einbindung der Liganden in so genannte „membrane rafts“ zugesprochen worden (Taylor et al., 1993; Tabata and Kornberg, 1994; Lewis et al., 2001; Zeng et al., 2001). Die Signalübertragung durch Hh-Liganden verläuft zunächst über deren Bindung an Ptc-Rezeptoren (Chen and Struhl, 1996; Chen and Struhl, 1998; Stone et al., 1996). Dabei fungieren Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG; Bellaiche et al., 1998; The et al., 1999) und möglicherweise auch Megalin als Korezeptoren. Interessanterweise ist Megalin als Mitglied der LDL-Rezeptor Superfamilie verwandt mit LRP5 und 6, die Korezeptoren des Wnt-Signals darstellen (Christensen and Birn, 2002). In Vertebraten stellen Hedgehog-interagierendes Protein 1 (HIP1; Chuang and McMahon, 1999) und ein Faktor mit dem Namen Growth Arrest Specific 1 (GAS1; Lee et al., 2001) weitere Interaktionspartner von Hh-Liganden an der Zelloberfläche dar, die jedoch der Weiterleitung des Signals entgegenwirken. Durch die Bindung von Hh-Liganden an Ptc wird auf bisher ungeklärte Weise die Ptc-vermittelte Inhibition von Smo aufgehoben. Durch einen unbekannten Mechanismus wird das Signal von Smo intrazellulär weitergeleitet. Dabei wird wahrscheinlich abhängig von

der Konzentration des Liganden die Phosphorylierung von Gli-Proteinen eingestellt und die Serin/Threonin-Kinase Fused (Preat et al., 1990) aktiviert, welche durch Phosphorylierung von Cos2 möglicherweise die Ablösung der Transkriptionsfaktoren von den Mikrotubuli bewirkt (Ascano, Jr. et al., 2002; Nybakken et al., 2002). Dabei wird mit der Unterdrückung der Gli-Phosphorylierung die Neuentstehung von repressiv wirkenden Gli-Fragmenten durch Proteolyse inhibiert. Dissoziation von den Mikrotubuli erlaubt es Ci/Gli-Transkriptionsfaktoren dann in den Kern einzutreten und die Transkription spezifischer Zielgene zu initiieren. Letzteres geschieht zusammen mit Koaktivatoren wie beispielsweise CBP (Akimaru et al., 1997; Dai et al., 1999). Auch die Beteiligung von Modifikatoren, welche kontextabhängig zur Expression unterschiedlicher Zielgene führen, ist diskutiert worden (Ingham and McMahon, 2001; Ruiz et al., 2002).

Eine weitere Stufe der Komplexität erhält der Hh-Signalweg durch die Tatsache, dass sowohl negativ wie auch positiv wirkende Signalkomponenten selbst Zielgene des Signalwegs sind oder in ihrer Expression durch den Signalweg unterdrückt werden. So wirkt beispielsweise die Expression von *Ptc* als Zielgen inhibitorisch auf den Signalweg (Hepker et al., 1997; Marigo and Tabin, 1996; Marigo et al., 1996b). Ein weiteres Zielgen ist *Hip1*, das für ein Membran-Glykoprotein kodiert, welches mit ähnlicher Affinität wie *Ptc* an Hh-Liganden bindet und dadurch die Signalübertragung durch den Liganden verhindert (Chuang and McMahon, 1999). Positive Rückkopplungsmechanismen werden durch die Induktion der *Gli1*- sowie durch die Repression der *Gli3*-Expression durch den Hh-Signalweg etabliert (Lee et al., 1997; Marigo et al., 1996a). *Gli3* wirkt dagegen nicht nur repressiv auf die Expression von Hh-Zielgenen, sondern auch auf die Expression von *Shh* selbst (Masuya et al., 1995; Altaba, 1998).

1.7 Die Ausbildung des Telenzephalons

Wie ich in meiner Arbeit zeige, kommt es bei der Maus durch den gemeinsamen Verlust von *Conductin* und einem *Axin*-Allel zu Missbildungen des Vorderhirns und dort vor allem zu Fehlbildungen des Telenzephalons. Die Struktur des Telenzephalons oder Endhirns bildet sich während der Embryogenese durch die paarige Ausstülpung zweier Vesikel aus dem primitiven Vorderhirn (Prosenzephalon). Es stellt den Bereich

höchster Komplexität im Zentralnervensystem der Vertebraten dar und ist beim Menschen der Sitz des Bewusstseins, des Erkenntnisvermögens, der Sprache, der Bewegungskontrolle und der Emotionen. Obwohl sich die Morphologie des adulten Telenzephalons verschiedener Vertebraten stark unterscheidet, ist der grundsätzliche strukturelle Aufbau während der Embryonalentwicklung konserviert. Dabei hat sich gezeigt, dass das Zusammenspiel unterschiedlicher Gewebe und Signalwege an der Induktion des Telenzephalons und seiner anschließenden dorso-ventralen Strukturierung beteiligt ist (Übersichtsartikel von Wilson and Rubenstein, 2000).

Der erste essentielle Schritt auf dem Weg zur Ausbildung des Telenzephalons ist die Spezifizierung anterioren neuralen Charakters am rostralen Rand der embryonalen Neuralplatte (Rubenstein et al., 1998; Varga et al., 1999; Inoue et al., 2000; Whitlock and Westerfield, 2000). Bei diesem Prozess, der auch als Kopfinduktion beschrieben wird, muss zunächst die Signalübertragung durch den Wnt- und Bmp-Signalweg inhibiert werden (vergl. Kapitel 1.5). Zusätzlich ist auch der Nodal/Activin-Signalweg mit der Entwicklung des Kopfes in Zusammenhang gebracht worden. Es bleibt jedoch weiter unklar, in welcher Weise dieser Signalweg reguliert werden muss, damit anteriore Strukturen entstehen können (Piccolo et al., 1999; Varlet et al., 1997).

Grundsätzlich scheinen diejenigen Faktoren, die zur Ausbildung des Vorderhirns führen, eine negative regulatorische Wirkung auf Signale auszuüben, die der anterioren Neuralplatte andernfalls posterioren Charakter verleihen würden. In Säugern ist möglicherweise das anteriore viszerale Endoderm (AVE) das Zentrum, aus welchem die der Posteriorisierung entgegenwirkenden Signale hervorgehen. So führt die Mutation von Genen, die notwendig für die Ausbildung des AVE sind, in der Maus zu Defekten in anterioren Strukturen und zum Verlust des Telenzephalons (Knoetgen et al., 1999; Perea-Gomez et al., 2001).

Anschließend an die Spezifizierung anterioren neuralen Charakters kommt den Zellen am rostralen Rand der anterioren Neuralplatte (engl. Anterior Neural Ridge, ANR) eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Telenzephalons zu (Shimamura and Rubenstein, 1997; Houart et al., 1998). Explantierte Neuralplatten verlieren beispielsweise nach dem Entfernen des ANR die Fähigkeit, die Expression des

Telenzephalon-spezifischen Markergens *Bf1* zu induzieren. In diesem Zusammenhang wird eine Funktion des ANR als Signalzentrum diskutiert, welches die Unterteilung der anterioren Neuralplatte in verschiedene Territorien reguliert, aus denen während der weiteren Entwicklung des Vorderhirns das Telenzephalon sowie das Dienzephalon und optische Strukturen entstehen (Wilson and Rubenstein, 2000). Tatsächlich konnten vor allem in Geninaktivierungs- und Überexpressionsexperimenten in der Maus bzw. in *Xenopus* und dem Zebrafisch mehrere Homeoboxgene identifiziert werden, die an der Musterbildung innerhalb der anterioren Neuralplatte und der nachfolgenden Ausbildung der genannten Strukturen beteiligt sind. Als Beispiele hierfür können *Hesx1/Anf-1* (Dattani et al., 1998; Ermakova et al., 1999), *Rx* (Andreazzoli et al., 1999), *Six3* (Oliver et al., 1995; Kobayashi et al., 1998) und *Pax6* (Hogan et al., 1986; Chow et al., 1999) gelten.

Nachdem anterior-posteriorer Charakter spezifiziert und die Neuralplatte strukturiert worden ist, kommt es in einem komplizierten Prozess, der als Neurulation bezeichnet wird, zur Auffaltung des ursprünglichen Neuralgewebes (Abb. 1.5; Übersicht bei Puelles, 2001). Das dabei entstehende Neuralrohr wird in dorso-ventraler Richtung in Dachplatte (roof plate, RP), alare Platte (AP), Basalplatte (BP) und Bodenplatte (floor plate, FP) unterteilt. Hat sich das Neuralrohr dorsal geschlossen, so beginnt die Ausstülpung des Telenzephalons und der Augen aus der alaren Platte. Gleichzeitig wird das Vorderhirn in sekundäres Prosenzephalon und Dienzephalon unterteilt. Im weiteren Verlauf der Entwicklung entstehen im Dienzephalon und sekundären Prosenzephalon die Prosomere p1-6. Zur selben Zeit nimmt das Telenzephalon weiter an Größe und Struktur zu. Hierbei entstehen auch der Streifenkörper, der sich weiter in den lateralen und medialen Streifenkörper (laterales und mediales Striatum, LS bzw. MS) unterteilt sowie die weiter ventral gelegene anteriore entopedunkuläre Zone (AEZ). Diese Strukturen entstehen als Antwort auf dorso-ventrale Musterbildungsprozesse. In der weiteren Entwicklung bilden sich hier Vorläufer neuronaler Zellpopulationen aus, die später eine Migrationsbewegung in ihr jeweiliges Zielgewebe antreten. Gleichzeitig scheinen die genannten Strukturen selbst Signalzentren darzustellen, die an der weiteren Strukturierung des sich entwickelnden Telenzephalons beteiligt sind (Wilson and Rubenstein, 2000; Spassky et al., 2001).

Wie beschrieben stehen anterior-posteriore Musterbildungsprozesse im Mittelpunkt der frühen Gehirnentwicklung bis hin zum Prosenzephalon. Die weitere Entwicklung des Gehirns wird dagegen weitgehend durch eine dorso-ventrale Strukturierung bestimmt, die zur Ausbildung spezifischer Strukturen aus dem primitiven Vorderhirn führt. Dabei gilt Shh als einer der entscheidenden Faktoren in der weiteren Entwicklung des Telenzephalons und spielt eine wichtige, im Detail jedoch noch nicht verstandene Rolle als Morphogen sowie in der Kontrolle von Proliferation und Differenzierung verschiedener Zellpopulationen. Defekte in der Entwicklung des ventralen Telenzephalons, welche auf eine Deregulation des Shh-Signalwegs zurückzuführen sind, wurden bei Mäusen und Fischen, aber auch beim Menschen beschrieben (vergl. Kapitel 1.8). Bis heute bleibt allerdings zu großen Teilen unklar, zu welchem Zeitpunkt, an welcher Stelle und in welcher Weise Shh für die Ausbildung des Telenzephalons benötigt wird.

Während die Aktivierung des Shh-Signalwegs essentiell für die Entwicklung des ventralen Telenzephalons zu sein scheint, vermittelt Gli3 anscheinend eine Repression des Signalwegs, wodurch die Entstehung dorsaler Strukturen gewährleistet wird. So zeigen *Gli3*-mutierte Mäuse im Vorderhirn den Verlust von dorsalen Markergenen und Strukturen (Theil et al., 1999; Tole et al., 2000). Vermittelt durch die lokal unterschiedlich starke Aktivierung bzw. Repression des Shh-Signalwegs kommt es anscheinend zur Expression verschiedener Homeobox-gene, die für die Musterbildung im entstehenden Telenzephalons verantwortlich sind. Dabei induzieren beispielsweise *Emx2* und *Pax6* einander entgegen gesetzte Prozesse und können in ihrem Zusammenspiel spezifischen Strukturen im dorsalen Telenzephalon regionale Identität verleihen (Bishop et al., 2000).

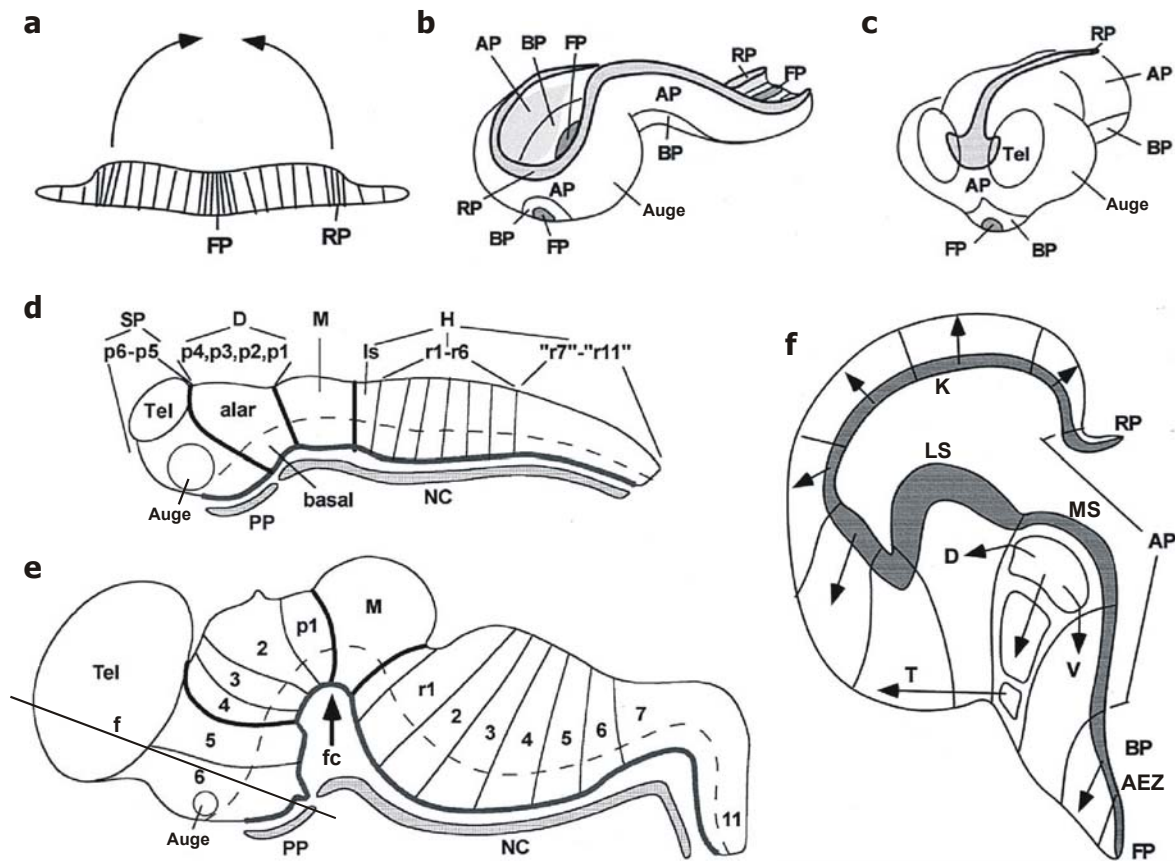


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Entstehung des Telenzephalons. (a) Während der Neurulation kommt es zu einer Deformation der Neuralplatte, bei der laterale Bereiche in dorsaler Richtung (Pfeile in a) aufgefaltet werden. (b) Durch die Auffaltung der Neuralplatte entsteht das Neuralrohr. (c) Nachdem sich das Neuralrohr im Vorderhirnbereich dorsal geschlossen hat, beginnt die Ausstülpung des Telenzephalons (Tel) und der Augen aus der alaren Platte (AP). (d) Seitenansicht des Neuralrohrs. Mit dem Beginn der Ausstülpung des Telenzephalons findet gleichzeitig die Unterteilung des Vorderhirns in Di- und sekundäres Prosenzephalon (SP) statt. (e) Während der weiteren Entwicklung nimmt das Telenzephalon an Größe zu und entwickelt spezifische Substrukturen. Das Di- und das sekundäre Prosenzephalon werden in 6 Prosomere unterteilt (p1-6). (f) Schnitt durch das Telenzephalon entlang der in (e) dargestellten Ebene. Die im Text benannten Strukturen sind gekennzeichnet (AEZ, anteriore entopedunkuläre Zone; K, Kortex; LS, lateraler Streifenkörper; MS, medialer Streifenkörper). Zum besseren Verständnis der durch die Ausstülpung des Telenzephalons verzerrten räumlichen Dimensionen des Vorderhirns, sind die topologischen Relationen durch Pfeile gekennzeichnet (D, dorsal; V, ventral; T, tangential; unbeschriftete Pfeile markieren die radiale Ausdehnung). Weitere Abkürzungen: BP, Basalplatte; fc, flexura cephalica; FP, Bodenplatte; H, Hinterhirn; Is, Isthmus; M, Mittelhirn; NC, Notochord; PP, Prächordalplatte; r, Rhombomer; RP, Dachplatte. Darstellungen übernommen aus Puelles, 2001.

Neben verschiedenen Homeoboxgenen sind unter anderen auch Transkriptionsfaktoren aus der bHLH-Familie an der Entwicklung des Telenzephalons beteiligt. Für *Mash1* wird beispielsweise ein Zusammenhang mit dem Shh-Signal diskutiert: So könnte die Expression von *Mash1* ventrale Zellen erst in die Lage versetzen, das Shh-Signal zu empfangen; andererseits könnte die *Mash1*-Expression aber auch mittelbar durch Shh induziert werden (Fode et al., 2000).

Zusätzlich zu ihrer Funktion in der frühen Gehirnentwicklung scheinen sowohl der Wnt- wie auch der Bmp-Signalweg eine Rolle in der dorso-ventralen Strukturierung des Telenzephalons zu spielen. So führt die Überexpression von *Bmp4* und *Bmp5* im Vorderhirn des Huhns zu ähnlichen Phänotypen, wie sie durch Störungen im Shh-Signalweg hervorgerufen werden, d.h. zum Verlust ventraler Strukturen (Golden et al., 1999). Bislang fehlen zwar detaillierte Untersuchungen über die Beteiligung des Wnt-Signalwegs an der späten Entwicklung des Telenzephalons; Fehlbildungen, die auf Mutationen in *Wnt3a* oder *LEF1* zurückzuführen sind, legen jedoch eine Funktion des Wnt-Signals in der Entwicklung dorsaler Strukturen nahe (siehe auch Kapitel 1.5).

Die letzte Entwicklungsstufe in der Ausbildung des Telenzephalons ist die Einwanderung verschiedener neuronaler Zelltypen in ihr Zielgewebe. Diverse Unterklassen von Neuronen werden vor allem im Striatum aber auch in der anterioren entopedunkularen Zone (AEZ) ausgebildet, von wo aus sie in der späten Entwicklung des Vorderhirns die Großhirnrinde (Kortex) bevölkern (Abb. 1.5). Mutationen, die später zum Verlust bestimmter neuronaler Zellpopulationen führen, verursachen häufig schon zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt Defekte in denjenigen Strukturen, aus denen die Zellen auswandern. So wird beispielsweise in *Nkx2.1*-mutierten Mäusen der mediale Streifenkörper nicht ausgebildet. Dies führt später dazu, dass sämtliche cholinergen Neuronen im Telenzephalon fehlen (Sussel et al., 1999; Marin et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich die Entstehung des Telenzephalons auf zwei Musterbildungsprozesse während der Embryogenese zurückführen: Zunächst wird die Neuralplatte einer anterior-posterioren Strukturierung unterzogen. Am rostralen Ende kommt es daraufhin zur Ausbildung des Prosenzephalons. Die Ausstülpung der

lateralen Ventrikel des Telenzephalons steht unter der Kontrolle dorso-ventraler Musterbildungsprozesse, die gleichzeitig die Entstehung spezifischer Substrukturen, wie beispielsweise des lateralen und medialen Striatums, steuern. Diese Substrukturen ermöglichen schließlich die Bildung definierter neuronaler Zellpopulationen, welche nach Auswanderung in ihre Zielgewebe erst die Funktionalität des adulten Neokortex gewährleisten.

1.8 Holoprosenzephalie

Mit dem Terminus Holoprosenzephalie (HPE) bezeichnet man die beim Menschen häufigste Form angeborener Fehlbildungen des Vorderhirns und des Gesichts. HPE ist zurückzuführen auf Mittelliniendefekte des Embryos, die durch fehlerhafte Musterbildungsprozesse während der Entwicklung des Vorderhirns verursacht werden. In schweren Fällen kommt es zu Defekten bei der Ausstülpung der lateralen Ventrikel des Telenzephalons, der Augen und des Riechhirns aus dem Prosenzephalon. Die betroffenen Feten verfügen nur über ein einziges zentrales Vorderhirnventrikel, zeigen häufig Zyklopie und rüsselartige Nasenrudimente und sterben *in utero* oder kurz nach der Geburt. Man spricht in diesem Fall von alobärer HPE. Bei der semilobären HPE werden weniger stark ausgeprägte faziale Defekte beobachtet. Die Ventrikel des Telenzephalons sind angelegt, jedoch teilweise fusioniert. Daneben wurden Fälle von lobärer HPE beschrieben, die auch als Mikroformen der HPE bezeichnet werden. Diese sind charakterisiert durch kraniofaziale Anomalien, die nicht unbedingt mit Fehlbildungen des Gehirns verbunden sein müssen (Übersicht bei Nanni et al., 2000).

Es wird geschätzt, dass rund ein Fall von HPE auf 250 Schwangerschaften kommt (Matsunaga and Shiota, 1977), dabei weisen von 20000 Lebendgeburten allerdings nur ein bis zwei HPE auf (Croen et al., 1996; Roach et al., 1975). Ein Großteil der Fälle scheint sporadisch aufzutreten, wobei verschiedene Teratogene für die Entstehung von HPE verantwortlich gemacht worden sind (Cohen, Jr. and Shiota, 2002). Daneben wurden jedoch auch eine Reihe genetischer Ursachen der HPE identifiziert, die etwa 15-20% aller HPE-Fälle verursachen. Am besten dokumentiert sind in diesem Zusammenhang Mutationen, die den Shh-Signalweg betreffen. So finden sich am häufigsten Mutationen im *Shh*-Gen selbst (Belloni et al., 1996; Nanni

et al., 1999; Roessler et al., 1996; Roessler et al., 1997), aber auch in Genen, die für Komponenten des Shh-Signalwegs, wie etwa den Rezeptor Ptc (Ming et al., 2002) oder Gli-Transkriptionsfaktoren (Ming and Muenke, 2002) kodieren. Interessanterweise ist auch für das Teratogen Cyclopamin, welches im Tierversuch HPE hervorruft, eine negative Regulation des Shh-Signalwegs nachgewiesen worden (Incardona et al., 1998).

Neben Mitgliedern des Shh-Signalwegs wurden einer Reihe weiterer Gene in Verbindung mit HPE gebracht. So sind Mutationen in *Zic2* (Brown et al., 2001; Brown et al., 1998; Marcorelles et al., 2002), *Six3* (Pasquier et al., 2000; Wallis et al., 1999), *TGIF* (Chen et al., 2002; Gripp et al., 2000), *TDGF1* (Cripto; de la Cruz et al., 2002) und *Fast1* (Ming and Muenke, 2002) in Patienten mit HPE identifiziert worden. Außer für das Homeoboxgen *Six3* ist für alle anderen Gene, deren Mutation HPE auslösen kann, eine Verbindung zum Shh-Signalweg beschrieben worden. Zic-Transkriptionsfaktoren sind in der Modulation der Expression von Shh-Zielgenen impliziert worden (Koyabu et al., 2001; Mizugishi et al., 2001). TGIF, TDGF1 und Fast1 sind Komponenten des Nodal-Signalwegs. Im Zebrafisch konnte eine direkte Aktivierung der *Shh*-Transkription durch den Nodal-Signalweg nachgewiesen werden (Muller et al., 2000). Sowohl der Verlust des Nodal-Korezeptors TDGF1, des Transkriptionsfaktors Fast1 sowie die *TGIF*-Mutation, die in der Synthese eines dominanten Repressors resultiert, könnten daher zu einer Verminderung der Transkription von *Shh* selbst führen. Die daraus resultierende Reduktion des Shh-Signals wäre dann für die Ausbildung der HPE verantwortlich. Es ist möglich, dass Störungen in unterschiedlichen Signalwegen zu morphologisch sehr ähnlichen Fehlbildungen führen. Trotzdem spricht vieles dafür, dass der Shh-Signalweg der Prozess ist, an dem alle Mechanismen, die zur HPE führen, konvergieren. Der entscheidende Schritt, welcher die rostralen Fehlbildungen verursacht, ist damit die gestörte Musterbildung im Vorderhirn, die durch die Deregulation von Shh-Zielgenen bedingt ist.

1.9 Zielsetzung

Der Verlust von Axin führt zu einer Verdoppelung der primären Körperachse und zum Tod des Embryos früh in der Entwicklung. Obwohl Conductin *in vitro* dieselben Funktionen wie Axin ausübt, kann es während der Embryonalentwicklung offensichtlich nicht für den Verlust von Axin kompensieren. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, mit Hilfe der homologen Rekombination eine Mutation in den *Conductin*-Lokus einzuführen, die zum Verlust des Conductin-Proteins in der Maus bei gleichzeitiger Transkription eines Reportergens unter der Kontrolle des *Conductin*-Promotors führt. Dieser genetische Ansatz sollte Aufschluss über die Expression und Funktion von Conductin während der Embryogenese geben. Durch die Kreuzung von *Conductin*-, *Axin*- sowie β -*Catenin*-mutierten Tieren sollte weiterhin das Zusammenspiel der homologen Proteine Conductin und Axin in der Entwicklung der Maus analysiert und die beobachteten genetisch bedingten Defekte in den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg eingeordnet werden.

2 Ergebnisse

2.1 Deletion des *Conductin*-Gens durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen

Durch die Ergebnisse zahlreicher Forschungsgruppen wurde in jüngster Zeit die essentielle Bedeutung des kanonischen Wnt-Signalwegs in unterschiedlichen Geweben und zu verschiedenen Zeiten der Embryogenese deutlich (vergl. Einleitung). Hierbei steht die Stabilität von zytoplasmatischem β -Catenin als Überträger des Signals im Mittelpunkt. Die homologen Proteine Conductin und Axin stellen die zentrale Komponente derjenigen zellulären Maschinerie dar, die den Abbau von β -Catenin in der Zelle induziert. Um die Auswirkungen des Verlusts dieser beiden Komponenten *in vivo* zu untersuchen, habe ich zunächst das Conductin Gen in der Maus deletiert und die mutierten Mäuse anschließend mit Mäusen verpaart, die eine Mutation auf dem Axin Gen tragen (Axin^{Tg1}; Zeng et al., 1997).

Durch diesen genetischen Ansatz sollte die Funktion von Conductin während der Embryogenese untersucht sowie das Zusammenspiel der homologen Proteine Conductin und Axin in der Entwicklung charakterisiert werden. So sind die beiden Proteine zwar nur zu 45% identisch, zeigen aber in sämtlichen bisher *in vitro* durchgeführten Experimenten gleiches Verhalten. Durch das individuelle und kombinierte Ausschalten der beiden Gene kann die Funktion des β -Catenin-Abbaukomplexes in unterschiedlichem Ausmaß gestört werden. Interessanterweise zeigen Embryonen beim Verlust von Axin eine Verdoppelung der anterior-posterioren Achse und sterben am Tag 9 der Embryogenese ab (Zeng et al., 1997). *APC*-mutierte Embryonen, deren β -Catenin-Abbaukomplex ebenfalls beeinträchtigt ist, entwickeln sich nur bis zum Tag 6,5, wobei der Einfluss der Mutation auf die Achsenbildung bislang nicht untersucht wurde (Moser et al., 1995b).

Zur Deletion des Conductin Gens habe ich die Technik der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) angewandt (Thomas and Capecchi, 1987). Hierzu wurde zunächst ein so genannter „targeting“-Vektor auf der Grundlage der genomischen Sequenz des Conductin Gens im Bereich des zweiten Exons generiert (Abb. 2.1a). Exon 2 enthält das Startkodon für den Beginn der Proteinsynthese und

kodiert für knapp ein Drittel des Proteins einschließlich der RGS-Domäne. Der Vektor wurde so konstruiert, dass der Großteil der durch Exon 2 kodierten Sequenz (entsprechend Aminosäuren 1 bis 266) durch exogene Sequenzen ersetzt wurde. Hierbei wurde das für die bakterielle β -Galaktosidase kodierende Gen (*lacZ*) mit vorangestelltem Kernlokalisierungssignal im Leserahmen nach dem Startkodon des *Conductin* Gens eingefügt. Diesem folgt ein Neomycinresistenzgen (*neo*), welches gegen die Leserichtung des *Conductin* Gens eingesetzt wurde. Am 5'-Ende wurde schließlich eine HSV-TK Kasse (kodierend für die Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus) eingeführt. Der linearisierte „targeting“-Vektor wurde durch Elektroporation in ES-Zellen der Linie E14.1 transfiziert. Durch die Selektion mit Neomycin und Gancyclovir konnte die Anzahl von Integrationen gegenüber der homologen Rekombination minimiert werden. Die genomische DNA Neomycin-resistenter ES-Zellklone wurde durch Southern Blot auf korrekte homologe Rekombination hin untersucht. Durch die in der *lacZ*-Kasse gelegene *EcoRI*-Erkennungsstelle entstand nach Restriktionsverdau ein Fragment, welches um 1,5 kb kleiner als das mit der externen Sonde detektierte endogene Fragment ist (Abb. 2.1b).

Zwei ES-Zellklone mit heterozygoter *Conductin*-Mutation wurden in Blastozysten der Mauslinie C57Bl/6J injiziert. Die chimären Embryonen wurden in den Uterus von scheinsschwangeren Ammenmäusen injiziert. Da die ES Zelllinie E14.1 aus weißen Mäusen (129/Ola) erstellt wurde und C57Bl/6J schwarzes Fell tragen, ließ sich der Chimäritätsgrad der Nachkommen anhand der Fellfarbe abschätzen. Von den Ammenmäusen wurden 25 männliche und 8 weibliche Mäuse geboren, die von der Fellfarbe her alle als chimär gewertet wurden. Chimäre Männchen wurden mit C57Bl/6J-Weibchen verpaart. Genotypisierung der Nachkommen mittels Southern Blot oder PCR ergab, dass 8 der Männchen die *Conductin*-Mutation in der Keimbahn trugen und sie somit an die nächste Generation weitergeben konnten.

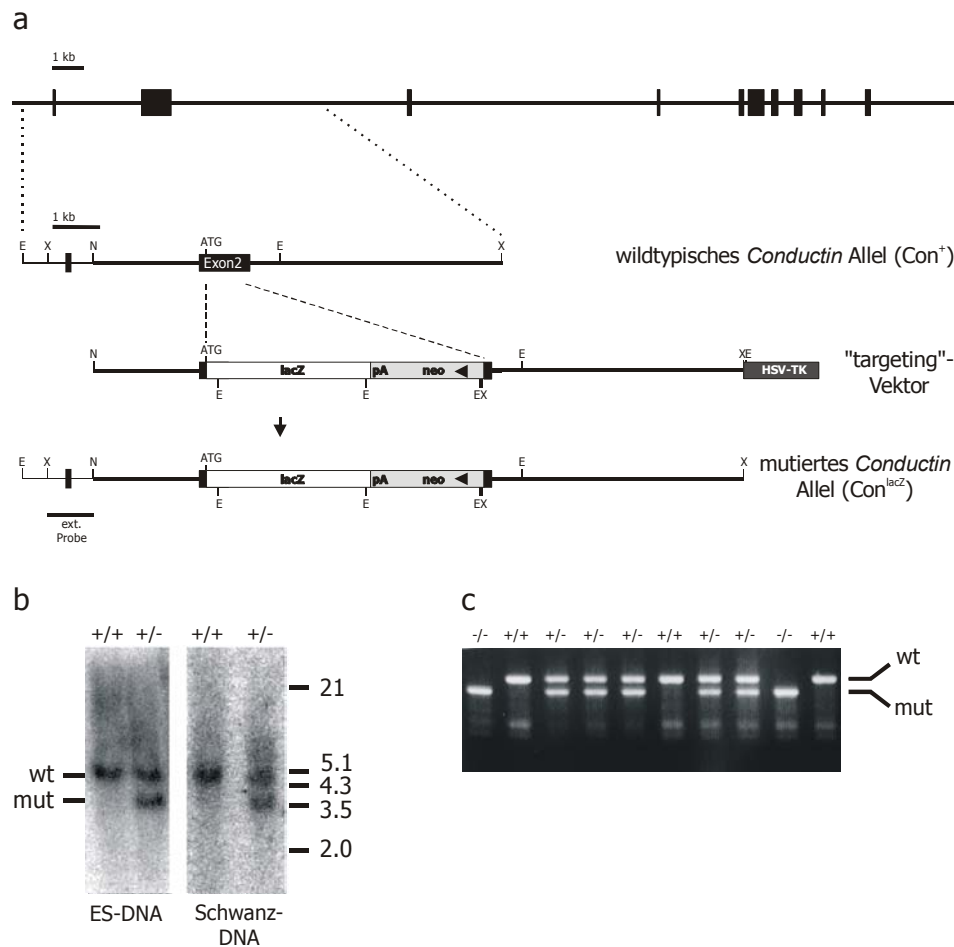


Abb. 2.1: Zielgerichtete Mutagenese von *Conductin* in der Maus. (a) Schematische Darstellung des 11 Exone umfassenden wildtypischen *Conductin*-Lokus (Con^{+} , der Bereich in der Umgebung der ersten beiden Exone ist vergrößert dargestellt), des „targeting“-Vektors und des mutierten *Conductin*-Allels (Con^{lacZ}). Die relative Lokalisation der Exone ist durch schwarze Rechtecke angezeigt. Im „targeting“-Vektor wurde ein Großteil von Exon 2 deletiert. In den deletierten Bereich wurde im Leserahmen des *Conductin*-Gens nach dem endogenen Startkodon (ATG) das bakterielle β -Galactosidase-Gen (*lacZ*) eingeführt. Ein Neomycinresistenzgen (*neo*) wurde gegen die Leserichtung des *Conductin*-Gens eingesetzt. Am 3'-Ende der verwendeten Sequenzen wurde eine HSV-TK-Kassette angefügt. Unterhalb des mutierten Allels ist der zum Genotypisieren mittels Southern Blot als Sonde verwendete Bereich eingezeichnet (ext. Probe). Buchstaben markieren Erkennungsstellen für Restriktionsendonukleasen, E *EcoRI*, N *NotI*, X *XbaI*. (b) Southern Blot Analyse von ES-Zell- und Mausschwanz-DNA. Die nach *EcoRI*-Verdau des wildtypischen und des mutierten Allels entstehenden Fragmente von rund 5 kb und 3,5 kb sind markiert, + Con^{+} , - Con^{lacZ} . (c) PCR-Analyse der aus der Verpaarung zweier heterozygot mutierter Mäuse hervorgegangenen Nachkommen. Die in der PCR amplifizierten Banden repräsentieren das wildtypische und das mutierte Allel wie eingezeichnet. Mäuse, die die Mutation homozygot tragen, sind offensichtlich lebensfähig.

2.2 Verlust von Conductin führt zu keinen offensichtlichen phänotypischen Veränderungen

Verpaarung der heterozygot mutierten Tieren untereinander zeigte, dass homozygot mutierte Tiere lebensfähig sind (Abb. 2.1c). Um auszuschließen, dass ein trotz der eingeführten Mutation vorhandenes Restprotein die wesentlichen Funktionen von Conductin weiter erfüllen kann, wurde die Expression von *Conductin* auf Transkript- und Proteinebene untersucht. Es wurde RNA aus den Gehirnen und Protein aus den Lebern wildtypischer sowie heterozygot und homozygot mutierter Tiere isoliert. Ein Northern Blot mit einer gegen das 3'-Ende der *Conductin*-mRNA gerichteten Sonde zeigt eine Abnahme der Transkriptmenge vom Wildtyp zur heterozygoten Maus (Pfeil in Abb. 2.2a); in homozygot mutierten Mäusen ist die entsprechende mRNA abwesend. Eine gegen das 5'-Ende gerichtete Sonde zeigt gleichermaßen die Abwesenheit des wildtypischen Transkripts bei den homozygot mutierten Mäusen. Gleichzeitig erscheint eine kürzere mRNA-Spezies, die der mit dem 5'-Ende der *Conductin*-Sequenz fusionierten β -Galactosidase-Kassette entspricht (Pfeilspitze in Abb. 2.2a). Hierbei zeigt sich eine Zunahme der Intensität der Bande vom heterozygoten zum homozygoten Tier. Im Western Blot erkennt der gegen Conductin gerichtete monoklonale Antikörper C/G7 bei der homozygoten Maus kein Protein (Pfeil in Abb. 2.2b).

Der Verlust von Conductin scheint unter den gegebenen Haltungsbedingungen keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Tiere zu haben. Eine detaillierte Untersuchung der inneren Organe durch einen Pathologen zeigte keine offensichtlichen Fehlbildungen. Auch nach Gabe einer fettreichen und ballaststoffarmen Diät, die in unter anderem in *APC*-mutierten Mäusen zur schnelleren Ausbildung von Adenomen im Darm führt (Shivapurkar et al., 1992; Hioki et al., 1997; Mutanen et al., 2000), zeigten sich keine Tumorbildung homozygot mutierten Tieren.

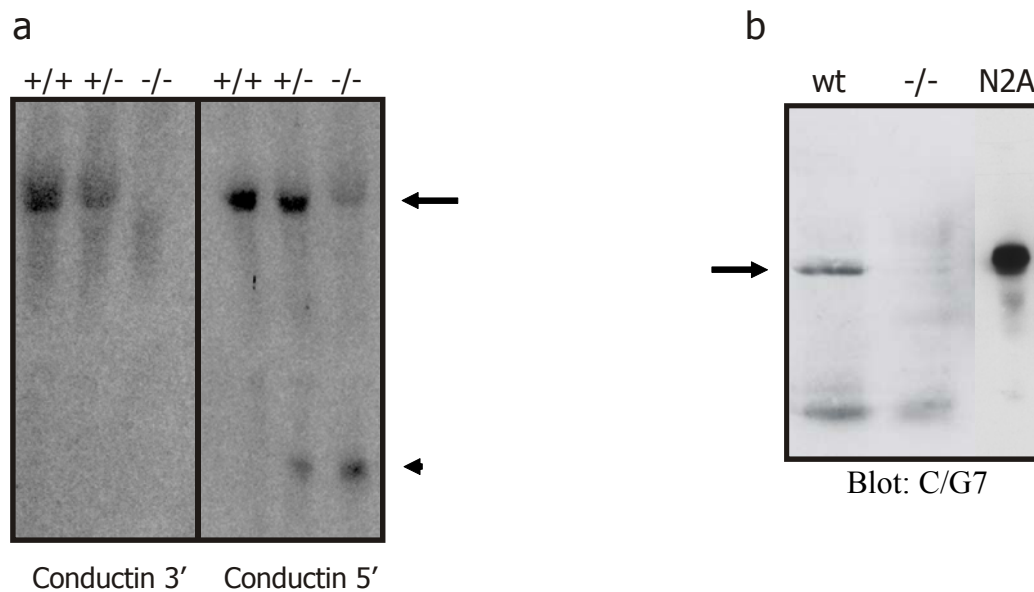


Abb. 2.2: Abwesenheit von wildtypischer mRNA und wildtypischem Protein in $\text{Con}^{\text{lacZ}/\text{lacZ}}$ -Mäusen. (a) Gesamt-RNA-Präparation aus den Gehirnen einer wildtypischen (+/+), einer $\text{Con}^{+/\text{lacZ}}$ (+/-) sowie einer homozygot mutierten (-/-) Maus. Sowohl eine Sonde vom 3'-Ende als auch vom 5'-Ende der Conductin-cDNA detektieren eine Abnahme der Conductin-mRNA vom wildtypischen zum heterozygot mutierten Tier (Pfeil). Die wildtypische mRNA-Spezies ist im homozygot mutierten Tier vollständig abwesend. Dafür wird mit der 5'-Sonde ein kürzeres Transkript markiert, welches der mit dem 5'-Ende von Conductin fusionierten β -Galactosidase entspricht (Pfeilspitze). (b) Protein-Präparation aus den Lebern von wildtypischen (wt) und homozygot mutierten (-/-) Tieren sowie aus in vitro mit einem Conductin-Expressionsplasmid transfizierten Neuro2A-Zellen (N2A). Der gegen Conductin gerichtete monoklonale Antikörper C/G7 erkennt bei $\text{Con}^{\text{lacZ}/\text{lacZ}}$ -Mäusen kein Protein (Pfeil).

2.3 Verlust eines *Axin*-Allels führt zu Holoprosenzephalie in $\text{Con}^{\text{lacZ}/\text{lacZ}}$ -Mäusen

Conductin und sein Homologes Axin sind zu 45% identisch. Beide Gene sind in der adulten Maus ubiquitär exprimiert (Abb. 2.3a und Zeng et al., 1997). Das hier unter der Kontrolle des endogenen *Conductin*-Promotors eingeführte β -Galactosidase-Gen erlaubt den Nachweis der *Conductin*-Expression durch eine einfache Färbereaktion. Die Expression von Conductin beginnt am Tag 6,5 der Embryogenese (Abb. 2.3c) und hält über deren ganzen Verlauf hin an (Abb. 2.3b-h). Hierbei zeigt sich Expression zunächst nur im posterioren Bereich. Ab E8,5 ist Conductin dann auch im Kopf und ab E9,5 ubiquitär exprimiert. Dabei zeigen sich vor allem die apikale ektodermale Leiste der Extremitätenknospen, das dorsale Neuralrohr, die

Kiemenbögen und der dorsale Rand des Endhirns (Telenzephalon) als Zentren starker Expression von *Conductin*. Im Gegensatz zu *Conductin* ist *Axin* schon in Blastozysten exprimiert (Zeng et al., 1997). Die durch *in situ* Hybridisierung nachgewiesenen Transkripte zeigen keine Zentren stärkerer Expression, sondern sind in gleichmäßiger Weise ubiquitär exprimiert (Abb. 2.3i-k und Zeng et al., 1997).

Während der Verlust von *Conductin* zu keinem offensichtlichen Phänotyp führt, bewirkt der Verlust von *Axin* eine Verdoppelung der primären Körperachse und den anschließenden Tod der Embryonen am Tag 9 der Entwicklung (Zeng et al., 1997). Um das mögliche Zusammenspiel von *Conductin* und *Axin* in der Embryogenese zu charakterisieren, wurden die von Dr. Costantini, Columbia University, New York, freundlicherweise zur Verfügung gestellten *Axin*-mutierten Mäuse (*Axin*^{Tg1}) mit den von mir generierten *Conductin*-mutierten Tieren verpaart. Dabei tragen *Axin*^{Tg1}-Mäuse eine Mutation des *Axin*-Lokus, bei der auf Grund einer Transgen-Insertion bei gleichzeitiger Deletion des zweiten Exons *Axin* nicht exprimiert wird. Interessanterweise zeigte sich, dass bei Anwesenheit nur eines *Axin*-Allels der Verlust von *Conductin* (*Con*^{lacZ/lacZ};*Ax*^{Tg1/+}) schwere kraniofaziale und Vorderhirn-Defekte nach sich zieht (Abb. 2.4). Bei neugeborenen Mäusen (P0) häufig auftretende Merkmale sind die Ausbildung von Gaumenspalten (Abb. 2.4c,d) oder eines rüsselartigen Gesichts (Abb. 2.4f,g). Daneben kommt es oft zum Verlust eines oder beider Augen, einhergehend mit der Abwesenheit der entsprechenden Hemisphäre des Telenzephalons (Abb. 2.4d,e und g,h). In der Skelettfärbung zeigen sich deutlich unterschiedliche Ausprägungen des Phänotyps: So reichen die skeletalen Defekte von unterschiedlich starken Verkürzungen der anterioren Kopfstrukturen (Abb. 2.4j,k) bis hin zur Abwesenheit großer Bereiche des kranialen Skeletts (Abb. 2.4l). Im Weiteren ist zu beobachten, dass neugeborene *Con*^{lacZ/lacZ};*Ax*^{Tg1/+} kleiner sind als ihre Geschwister. *Con*^{lacZ/lacZ};*Ax*^{Tg1/+}-Mäuse sterben meist direkt nach der Geburt. Der Grund hierfür ist bislang unklar, ist aber wahrscheinlich sowohl in einer Obstruktion der Atemwege, wie auch dem Verlust des Telenzephalons zu suchen. Bisher zeigten sich rund 1% der Nachkommen mit dem Genotyp *Con*^{lacZ/lacZ};*Ax*^{Tg1/+} als überlebensfähig. Erste Beobachtungen deuten darauf hin, dass auch bei diesen Mäusen das Gehirn nicht korrekt entwickelt ist.

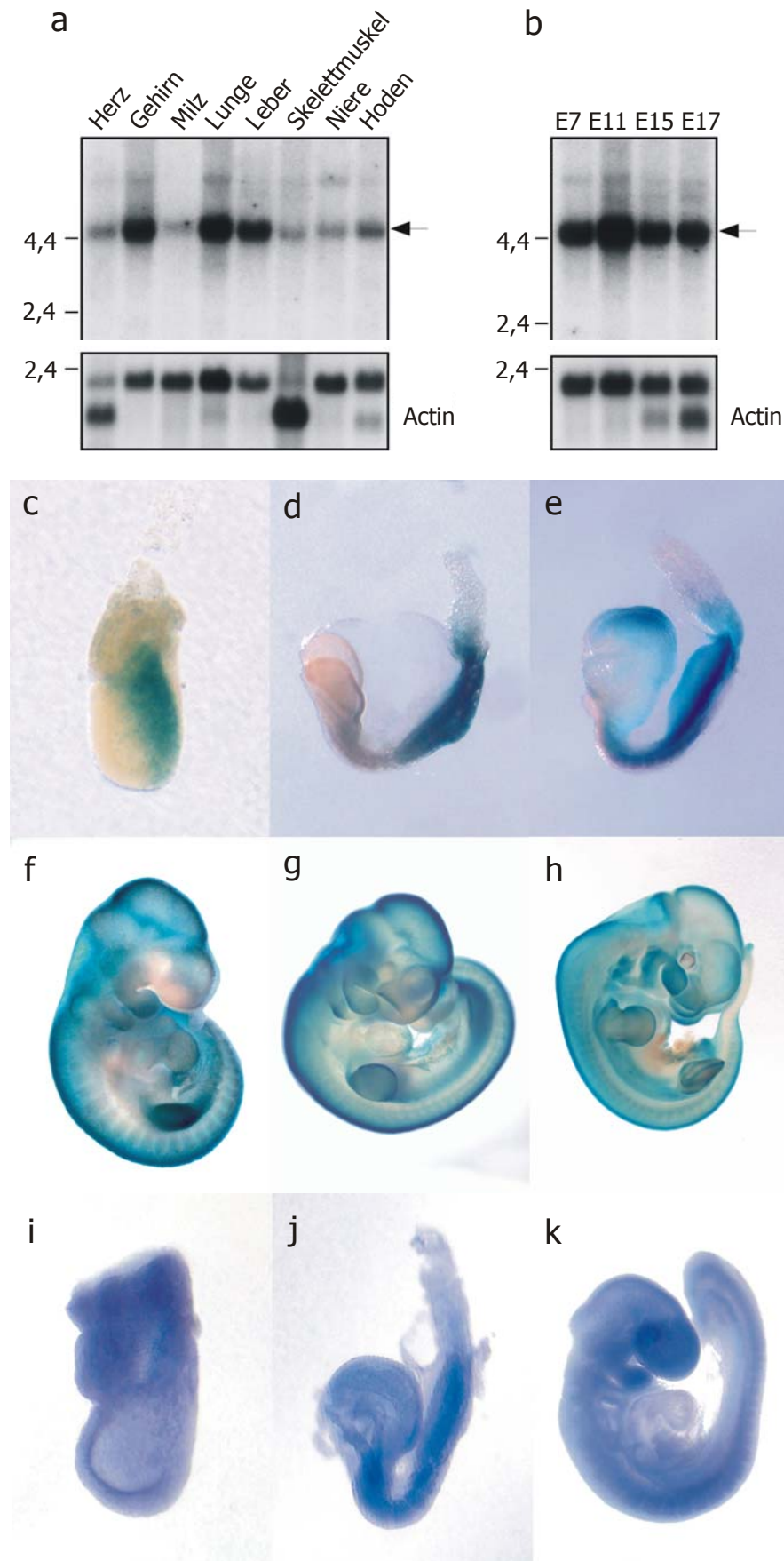


Abb. 2.3: Expression von Conductin und Axin in der Maus. (a) Im Northern Blot zeigt sich ubiquitäre Expression von Conductin in der adulten Maus. Dabei findet man besonders starke Expression im Gehirn, der Lunge und der Leber. (b) Während der Embryonalentwicklung zeigt der Northern Blot starke Expression von Conductin an allen untersuchten Zeitpunkten. (c) Die „whole mount“-Färbung auf β -Galactosidase-Aktivität zeigt Conductin-Expression ab E6,5 zunächst posterior. (d,e) An E8 dehnt sich die Expressionsdomäne weiter anterior aus, und Conductin ist an E8,5 auch im Kopf exprimiert. (f,g,h) Ab E9,5 zeigt sich ein ubiquitäres Expressionsmuster, wobei sich mit den apikalen ektodermalen Leisten, dem dorsalen Neuralrohr, den Kiemenbögen und dem dorsalen Rand des Telenzephalons Bereiche besonders starker Expression herausbilden. (i,j,k) In situ Hybridisierung gegen Axin-mRNA zeigt zu allen untersuchten Zeitpunkten eine gleichmäßige, ubiquitäre Expression.

Die bei $Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ Mäusen beobachteten phänotypischen Veränderungen ähneln der beim Menschen bekannten Fehlbildung der Holoprosenzephalie (HPE). Interessanterweise wird auch bei der HPE von unterschiedlicher Ausprägung der Missbildungen innerhalb von Familien berichtet (Nanni et al., 2000). So wird zwischen der alobären, semilobären und lobären Form der HPE unterschieden, welche alle in unterschiedlichem Ausmaß neben dem Vorderhirn auch die Entwicklung der Gesichtsstrukturen betreffen. Alle drei HPE-Formen sind bei Embryonen des Genotyps $Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ schon am Tag 12,5 der Entwicklung klar zu erkennen. So zeigt Abb. 2.5a einen Fall von alobärer HPE, bei dem eine Ausstülpung der beiden lateralen Ventrikel des Telenzephalons aus dem primitiven Vorderhirn (Prosenzephalon) nicht stattgefunden hat und sich ein rüsselartiges Gesicht entwickelt (vergl. auch Abb. 2.4h). Der Embryo in Abb. 2.5b ist ein Beispiel für eine semilobäre HPE: Die beiden Vesikel des Telenzephalons sind deutlich sichtbar, jedoch in ihrer Größe reduziert, und sie sind auf der posterioren Seite fusioniert. Zusätzlich sind faziale Fehlbildungen zu beobachten. Abb. 2.5c und d zeigen unterschiedliche Ausprägungen einer lobären HPE mit weitestgehend normal ausgebildetem Telenzephalon. Der Embryo in Abb. 2.5c hat eine starke Gaumenspalte, während der in Abb. 2.5d bis auf ein unterentwickeltes rechtes Auge von einem wildtypischen Embryo nicht zu unterscheiden ist.

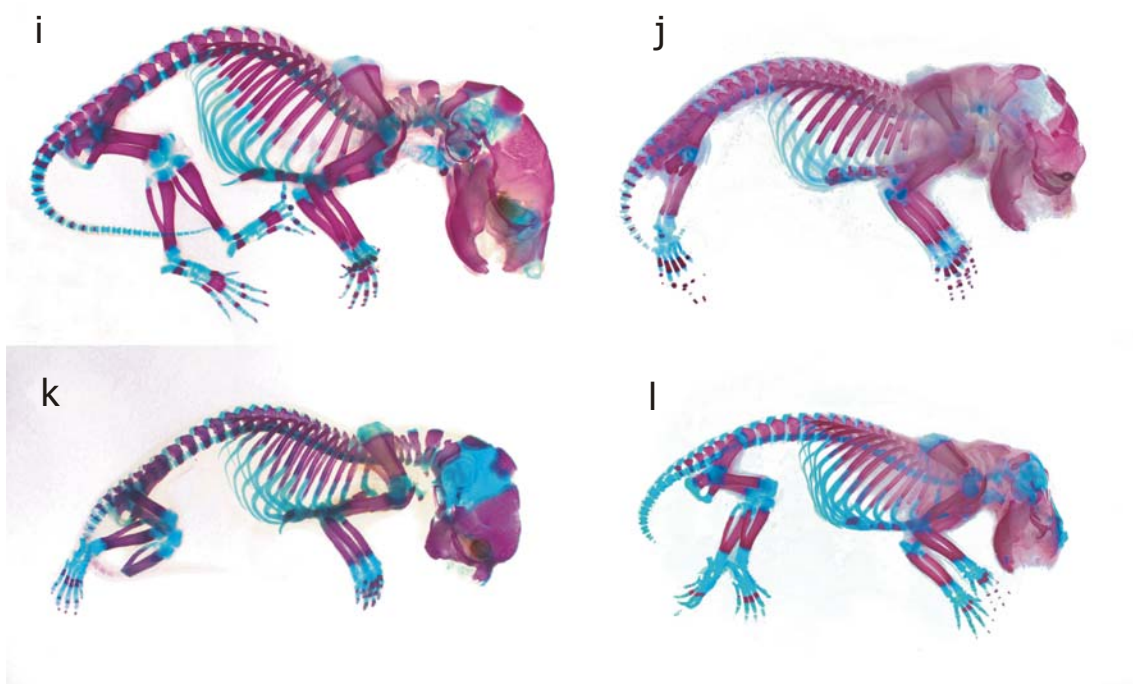
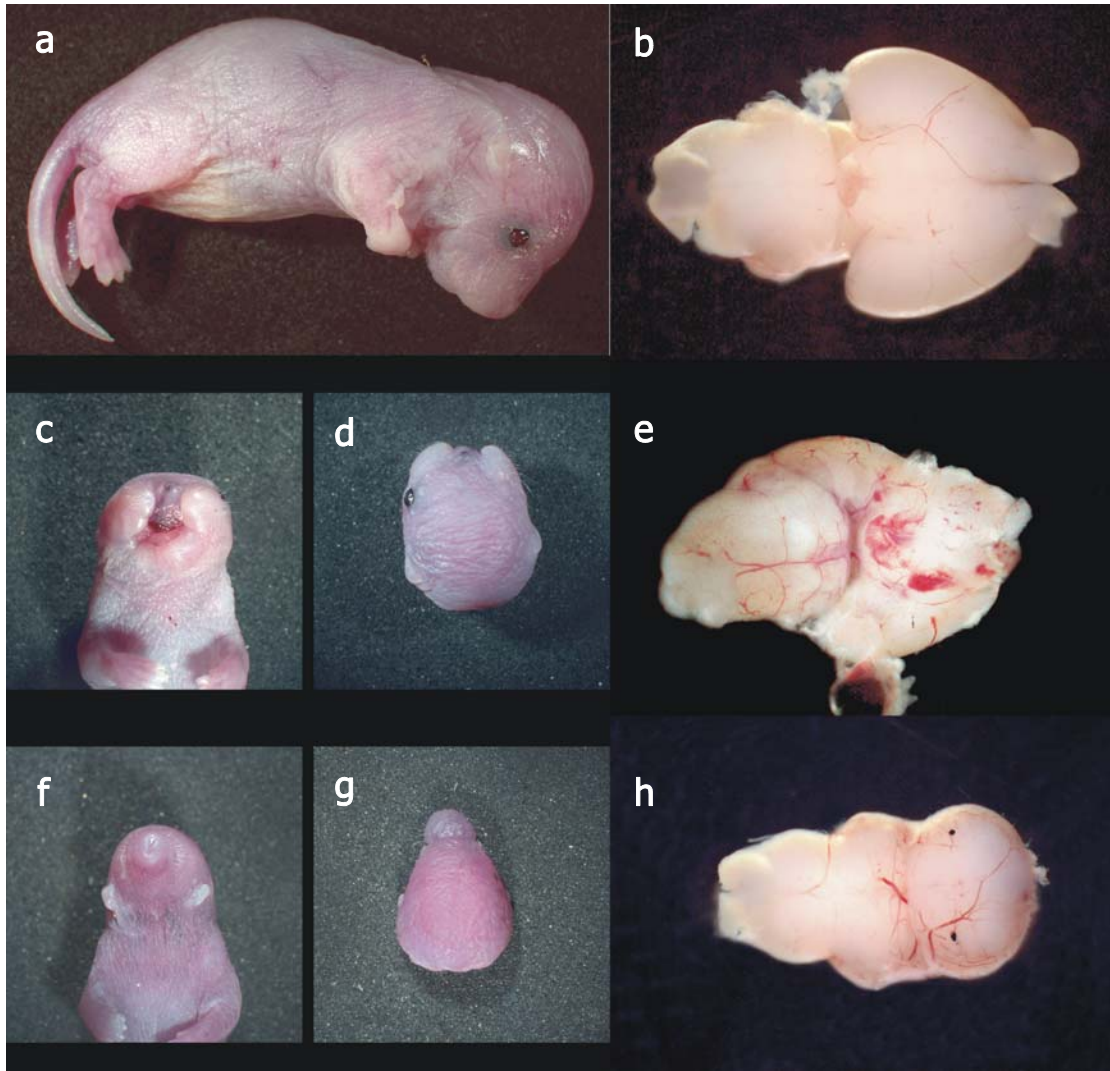


Abb. 2.4: $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Mäuse zeigen schwere kraniofaziale Defekte an P0. (a,b,i) Wildtypische und (c-h,j-l) $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Mäuse kurz nach der Geburt. (c,d und f,g) Bei neugeborenen Mäusen sind schwere Missbildungen im Bereich des Kopfes deutlich zu erkennen. So ist in c eine weite Gaumenspalte zu erkennen und das Jungtier verfügt nur über ein Auge auf der linken Seite (d). In einigen Fällen fehlen anteriore Strukturen des Gesichts einschließlich der Augen fast vollständig (f,g). (e,f) Das Fehlen der Augen korreliert mit dem Fehlen der entsprechenden Hemisphäre des Telenzephalons. (i-j) In der Skelettfärbung (Knochen rot, Knorpel blau) wird der Größenunterschied zwischen wildtypischen (i) und $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Jungtieren (j-l) deutlich. j-l zeigen unterschiedliche Ausprägungen des Phänotyps im Kopfbereich. Der Rest des Körpers erscheint nicht betroffen.

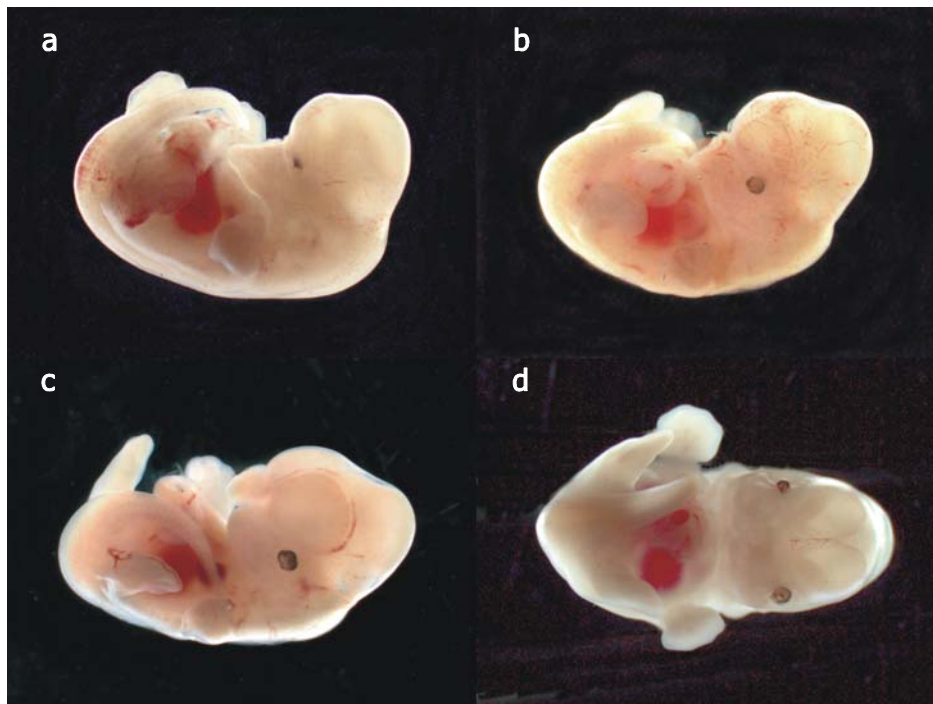


Abb. 2.5: Unterschiedliche Ausprägung des HPE-Phänotyps in $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Embryonen am Tag 12,5 der Entwicklung. (a) Alobäre HPE mit Verlust beider Hemisphären des Telenzephalons, nur einem, fast in der Mitte gelegenen Auge und einem rüsselartigen Nasenbereich. (b) Semilobäre HPE. Die beiden Vesikel des Telenzephalons sind zwar entwickelt, jedoch kaudal fusioniert. (c,d) Lobäre HPE. Beide Embryonen weisen ein äußerlich gesehen normal entwickeltes Telenzephalon auf. Der Embryo in c zeigt jedoch eine stark ausgeprägte Gaumenspalte, während der Embryo in d bis auf das fehlentwickelte rechte Auge einem wildtypischen Embryo gleicht.

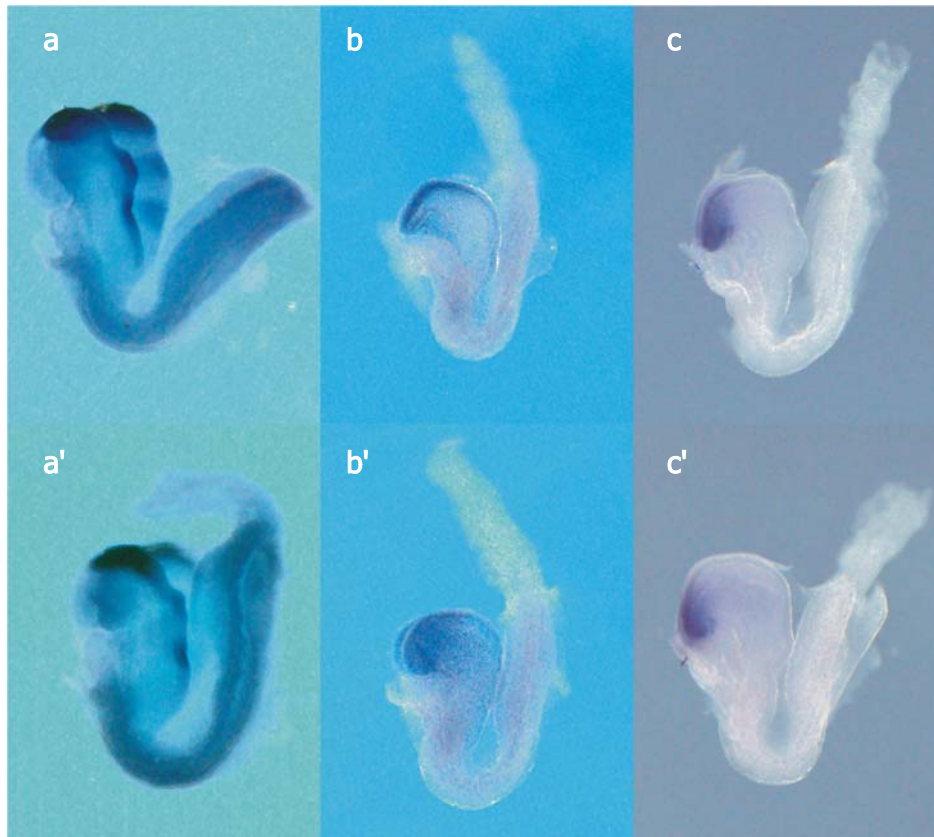


Abb. 2.6: Kopfinduktion verläuft normal in $Con^{lacZ/lacZ}; Ax^{Tg1/+}$ -Embryonen. (a,b,c) Wildtypische und (a',b',c') $Con^{lacZ/lacZ}; Ax^{Tg1/+}$ -Embryonen zum Zeitpunkt E8,5. *In situ* Hybridisierung mit Transkripten von *Krox20* (färbt Rhombomere 3 und 5) und *En1* (färbt Hinterhirn und Rhombomer 1; a,a') sowie mit *Otx2* (b,b') und *Hesx1* (c,c'; markieren anteriore Strukturen) zeigt normale Expressionsmuster in Embryonen mit dem Genotyp $Con^{lacZ/lacZ}; Ax^{Tg1/+}$.

2.4 Die initiale Kopfinduktion verläuft normal in $Con^{lacZ/lacZ}; Ax^{Tg1/+}$ -Mäusen

Es ist bekannt, dass bei Vertebraten gleichzeitig der Wnt- und BMP-Signalweg inhibiert werden müssen, damit eine korrekte Induktion des Kopfes stattfinden kann (vergl. Einleitung). So bewirkt beispielsweise der Verlust des Wnt-Antagonisten Dickkopf1 (*Dkk1*) in der Maus einen Verlust sämtlicher Kopfstrukturen anterior des Mittelhirns (Mesenzephalon; Mukhopadhyay et al., 2001). Aus diesem Grund habe ich untersucht, ob die Inaktivierung beider *Conductin*-Allele und eines *Axin*-Allels die Kopfinduktion in der Maus stört. Dazu wurde durch *in situ* Hybridisierung kurz nach der Gastrulation die Lokalisation unterschiedlicher Transkripte untersucht, die Aufschluss über die Entwicklung der frühen Kopfstrukturen geben. Die korrekte

Expression von *En1* im Mesenzephalon und Rhombomer 1 des Hinterhirns (Metenzephalon) sowie *Krox20* in den Rhombomeren 3 und 5 zeigt, dass die Strukturen im posterioren Bereich des Kopfes in *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen normal entwickelt sind (Abb. 2.6a,d). *Otx2* zeigt ein normales Expressionsmuster im Mesenzephalon und Prosenzephalon (Abb. 2.6b,e), und auch *Hesx1* ist im Prosenzephalon der *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen kurz nach der Induktion des Kopfes richtig exprimiert (Abb. 2.6c,f). Die korrekte Expression der untersuchten Marker-Gene deutet darauf hin, dass sich die mutierten Embryonen bis zu diesem Zeitpunkt normal entwickelt haben. Dies bedeutet gleichzeitig, dass die initiale Kopfinduktion in den *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}* mutierten Embryonen korrekt abläuft.

2.5 Fehlbildungen des Gehirns beschränken sich auf das Vorderhirn

Im frühen Embryo konnten weder morphologisch noch auf molekularer Ebene Unterschiede zwischen wildtypischen und *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde eine tiefer gehende Analyse von E12,5- und E13-Embryonen durchgeführt. Hierzu wurden Paraffinschnitte von wildtypischen und *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen angefertigt und deren Histologie miteinander verglichen. Außerdem wurden mit immunohistochemischen Methoden Unterschiede in der Zellproliferation untersucht sowie die Expression spezifischer Markergene analysiert, die Aufschluss über die Regionalisierung der einzelnen Hirnregionen geben sollten.

Das unterschiedliche äußere Erscheinungsbild der verschiedenen *Cor^{lacZ/lacZ}; Ax^{Tg1/+}*-Embryonen spiegelt sich auch in der histologischen Analyse wieder. Zur Verdeutlichung der beobachteten Defekte wurden Embryonen mit semilobärer HPE gewählt. Auf histologischer Ebene wird das Ausmaß der Fehlentwicklung des Vorderhirns sowie anderer anteriorer Kopfstrukturen erkennbar. So führt der Schnitt entlang der Mittellinie des Kopfes im wildtypischen Embryo durch den Balken (*Corpus callosum*), der sichelförmig den rostralen Abschluss des Zwischenhirns (Diencephalon) bildet. Aus diesem Grund ist keines der beiden lateral zu beiden Seiten gelegenen Ventrikel des Telenzephalons sichtbar. Stattdessen ist der mesenchymale Anteil des Balkens deutlich zu erkennen (Abb. 2.7a). Durch die Fusion

der beiden Ventrikel im *Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryo fehlt der Balken jedoch fast vollständig. Dem Dienzephalon ist daher ein einziges Vesikel vorgelagert, das ohne Unterbrechung von einer Seite des Kopfes zur anderen reicht (Abb. 2.7c). Noch deutlicher wird dies in koronalen Schnitten (Abb. 2.8): In der am weitesten rostral gelegenen Schnittebene (Abb. 2.8c) ist der medial gelegene Balken in der linken Bildhälfte deutlich zu erkennen. Dieser fehlt im *Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryo. In einer weiter lateral gelegenen Schnittebene wird deutlich, dass der mittlere Streifenkörper (*Corpus striatum mediale*) beim *Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}* Embryo vollständig fehlt (Abb. 2.7d, vergl. auch Abb. 2.8b,c), wobei dieser in anderen Fällen in Ansätzen vorhanden ist (nicht gezeigt). Gut sichtbar ist auch die Missbildung des Nasenbereiches, in dem sich keine olfaktorischen Strukturen ausbilden (Abb. 2.7b,d). Insgesamt legen die histologischen Beobachtungen nahe, dass sich die Unterschiede zwischen wildtypischen und *Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen auf den rostralen Bereich des Kopfes beschränken (Abb. 2.7 und 2.8a). Insbesondere die Strukturen des Met- und Mesenzephalons sind normal entwickelt, aber auch das Dienzephalon scheint in weiten Teilen nicht von Fehlbildungen betroffen zu sein.

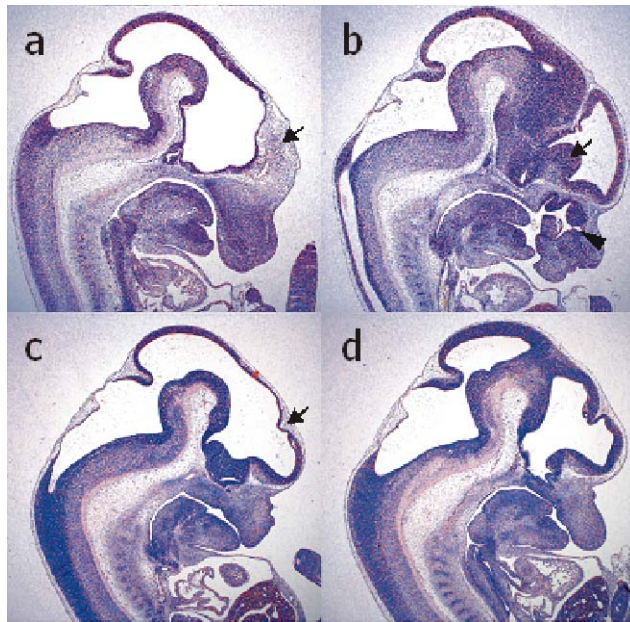


Abb. 2.7: Reduktion von Balken und Streifenkörper sowie Verlust olfaktorischer Strukturen bei $\text{Con}^{\text{lacZ/lacZ}};\text{Ax}^{\text{Tg1/+}}$ -Embryonen an E12,5. Sagittalschnitte durch den Kopfbereich eines wildtypischen (a,b) und eines $\text{Con}^{\text{lacZ/lacZ}};\text{Ax}^{\text{Tg1/+}}$ -Embryos mit semilobärer HPE (c,d). Das mesenchymale Gewebe des Balkens ist im $\text{Con}^{\text{lacZ/lacZ}};\text{Ax}^{\text{Tg1/+}}$ -Embryo stark reduziert (Pfeile in a,c). Dem dargestellten Embryo fehlen der mediale Streifenkörper sowie olfaktorische Strukturen (vergl. normal ausgebildete Strukturen beim wildtypischen Embryo in b, Pfeil bzw. Pfeilspitze).

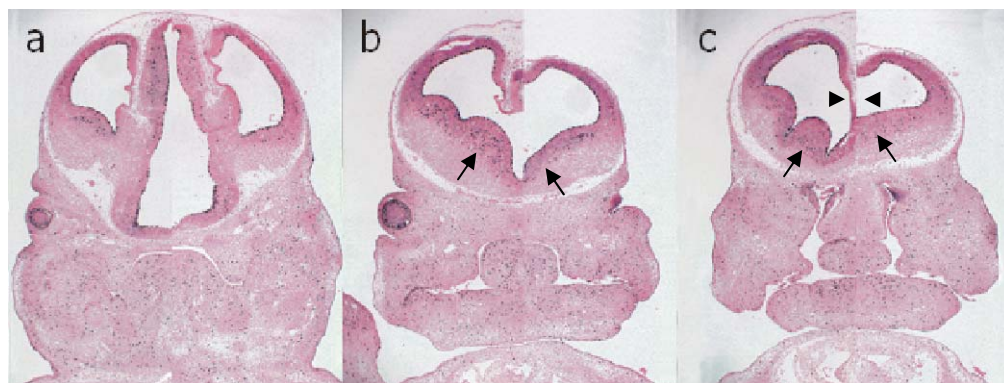


Abb. 2.8: Anteriorer neuroepithelialer Strukturen zeigen geringere Zellproliferation in $\text{Con}^{\text{lacZ/lacZ}};\text{Ax}^{\text{Tg1/+}}$ -Embryonen. Vergleich eines wildtypischen (a,b,c, linke Bildhälfte) mit einem mutierten Embryo mit semilobärer HPE (a,b,c, rechte Bildhälfte) in drei verschiedenen koronalen Schnittebenen. Immunohistochemische Markierung mitotischer Zellen mit einem gegen phosphoryliertes Histon H3 gerichteten Kaninchenserum. (a) Keine wesentlichen Unterschiede im kaudalen Telenzephalon. (b,c) Deutliche Unterentwicklung des ventral im Telenzephalon gelegenen Streifenkörpers. Besonders im Bereich des medialen Streifenkörpers zeigt sich stark reduzierte Proliferation im mutierten Embryo (Pfeile in b und c). Dorsal zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede in der Dicke des Neuroepithels. (c) Die Fusion der Vesikel des Telenzephalons durch den Verlust des Balkens ist klar zu erkennen (Pfeilspitzen).

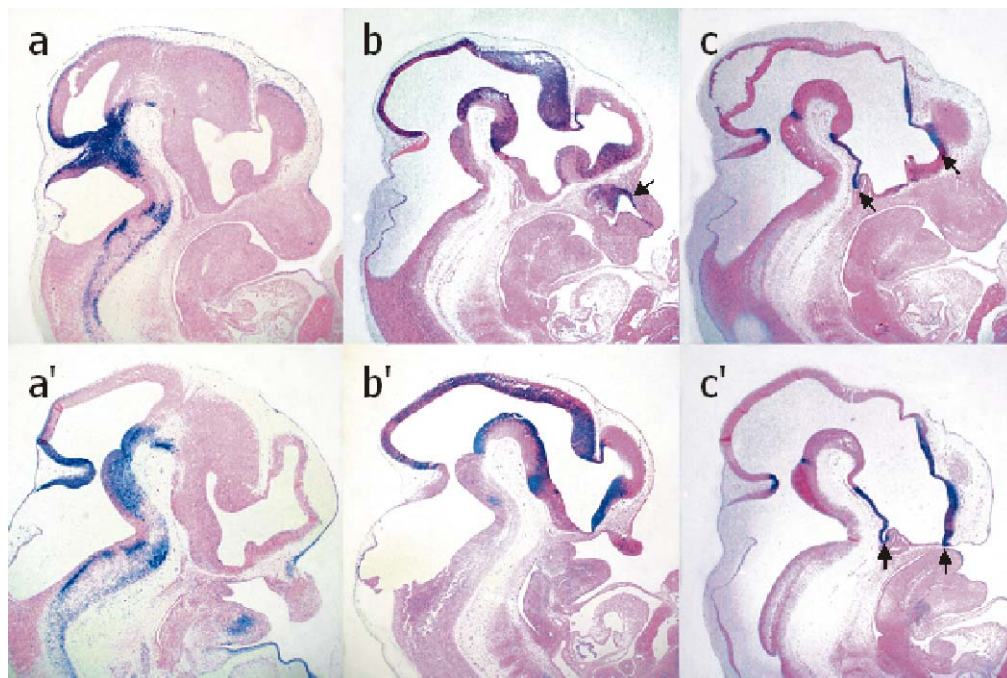


Abb. 2.9: Korrekte Unterteilung des Gehirns von $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Embryonen in Vorder-, Mittel- und Hinterhirn. In situ Hybridisierung auf sagittalen Schnitten durch den Kopfbereich eines wildtypischen (a-c) und eines $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Embryos (a'-c') an E12,5 zeigt korrekte Expression der Transkripte von *En1* (a,a'), *Otx2* (b,b') und *Fgf8* (c,c') im sich entwickelnden Gehirn. Das Fehlen der *Otx2*-Expression im Bereich der Nase verdeutlicht die Abwesenheit olfaktorischer Strukturen im mutierten Embryo (vergl. Pfeil in b). Der reduzierte Abstand zwischen dem ventralen und dem dorsalen *Fgf8*-Signal (Pfeile in c,c') deutet auf einen Verlust von Strukturen in diesem Bereich hin.

Wie die immunohistochemische Markierung mitotischer Zellen mit einem gegen phosphoryliertes Histon H3 gerichteten Kaninchenserum am Tag 13 der Entwicklung im Kopfbereich zeigt, besitzt der wildtypische Embryo mit dem Streifenkörper einen Bereich starker mitotischer Aktivität (Abb. 2.8). Im $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Embryo sind im Bereich des lateralen Streifenkörpers weniger sich teilende Zellen zu beobachten, und die proliferative Zone des medialen Streifenkörpers fehlt fast vollständig. Dies korreliert auch mit einer verminderten Dicke des Neuroepithels. Dagegen bleibt das proliferative Potential in der Grenzschicht zum Vesikel offensichtlich erhalten, und das Neuroepithel im dorsalen Bereich ist von normaler Dicke. Auch im Gesichtsmesenchym zeigt der $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Embryo normale mitotische Aktivität. Während die verminderte Gehirngröße der $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Embryonen offensichtlich eine Folge der Abnahme proliferierender Zellen im Vorderhirn ist,

scheint die Abwesenheit fazialer Strukturen nicht auf Unterschiede bei der Zellteilung zurückzuführen zu sein.

Auf molekularer Ebene wurde die Lokalisation verschiedener Transkripte im Kopfbereich durch *in situ* Hybridisierung visualisiert. Dabei markiert *En1* einen breiten Bereich sowohl rostral als auch caudal der Grenze zwischen Mes- und Metenzephalon. Die *En1*-mRNA erscheint in *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen am Tag 12,5 der Embryogenese korrekt exprimiert (Abb. 2.9a,a'). Auch dies bestätigt die histologischen Beobachtungen, denen zufolge das Gehirn in diesem Bereich normal entwickelt ist. Das Homeoboxgen *Otx2* ist im Mesenzephalon bis zum *Isthmus* hin normal exprimiert. Im Vorderhirn werden *Otx2*-Transkripte ventral detektiert (Abb. 2.9b,b'). Deutlich wird hierbei noch einmal die Abwesenheit olfaktorischer Strukturen, die im wildtypischen Embryo *Otx2* stark exprimieren. *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen zeigen in diesem Bereich dagegen keine *Otx2*-Expression. *Fgf8* zeigt im Kopfbereich mehrere Zentren starker Expression. Zum einen wird die Grenze zwischen Mes- und Metenzephalon markiert, daneben aber auch der dorsale und der ventrale Bereich des Dienzephalons bis hinein in das Infundibulum (Abb. 2.9c,c'). Auch *Fgf8* ist in *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen richtig exprimiert. Der reduzierte Abstand zwischen dem dorsalen und ventralen Signal lässt jedoch den Verlust ventraler Bereiche des Dienzephalons erkennen.

2.6 Verlust der *Shh*-Expression in der anterioren entopedunkularen Zone von *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen

Shh kodiert für ein Morphogen, das direkt für die dorso-ventrale Musterbildung im Zentralnervensystem verantwortlich ist. Mutationen in *Shh* sind mit dem Auftreten von HPE beim Menschen in Zusammenhang gebracht worden (Belloni et al., 1996; Nanni et al., 2000; Nanni et al., 1999; Roessler et al., 1996; Wallis and Muenke, 2000). Aus diesem Grund wurde das *Shh*-Expressionsmuster von *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen mit dem wildtypischer Embryonen verglichen. Hierbei zeigt sich erstmals am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung ein lokaler Verlust von *Shh* (Abb. 2.10a,b). Wie die „whole mount“ *in situ* Hybridisierung von *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen mit *Shh* verdeutlicht, bleibt das wildtypische Expressionsmuster im ventralen Neuralrohr, im Notochord und in der *Zona limitans interthalami* (ZLI) erhalten. Einzig das am

weitesten rostral gelegene *Shh*-Signal in der *anterioren entopedunkularen Zone* (AEZ) geht verloren. Interessanterweise sind in diesem Bereich klassische Zielgene des Shh-Signalwegs wie beispielsweise *Patched* und *Hnf3 β* nicht exprimiert (nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass Shh-Zielgene in unterschiedlichen Geweben verschieden reguliert werden.

Deutliche Unterschiede zwischen wildtypischen und *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen lieferte auch die Analyse der *Shh*-Expression am Tag 12,5 der Entwicklung (Abb. 2.10c,d). Während die ventral im Dienzephalon gelegene Expressionsdomäne posterior erhalten bleibt, zeigt sich beim mutierten Embryo eine starke Reduktion des *Shh*-Signals in der ventralen Region des anterioren Dienzephalons.

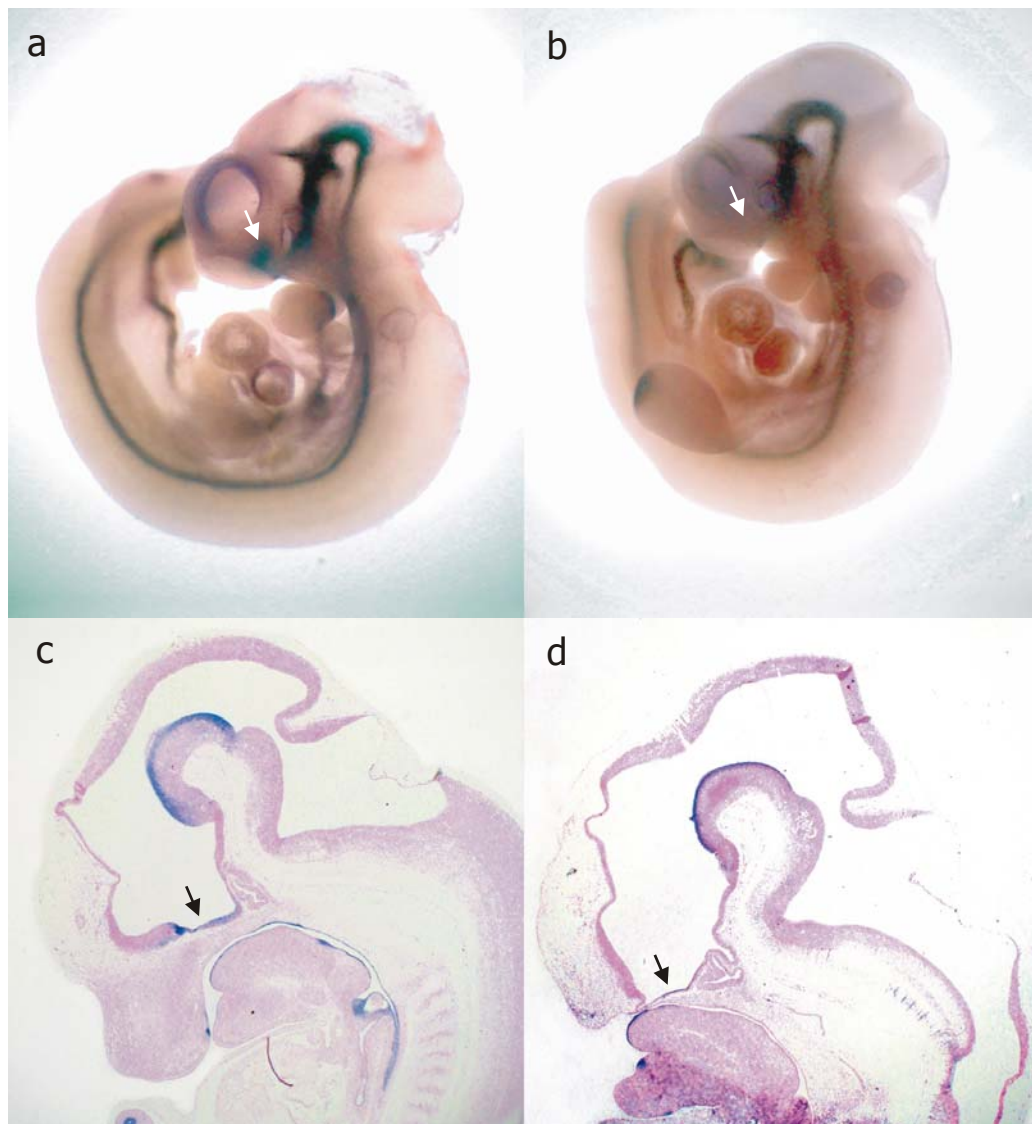


Abb. 2.10: Verlust von Shh-Expression im ventralen Vorderhirn von $\text{Con}^{\text{lacZ/lacZ}};\text{Ax}^{\text{Tg1/+}}$ -Embryonen. (a,b) „Whole mount“ in situ Hybridisierung mit Shh. Der wildtypische Embryo zeigt starke Expression in der anterioren entopedunkularen Zone (AEZ; a, Pfeil). Das Signal fehlt beim mutierten Embryo (b, Pfeil). (c,d) In situ Hybridisierung mit Shh auf sagittalen Schnitten durch den Kopf von E12,5 wildtypischem bzw. $\text{Con}^{\text{lacZ/lacZ}};\text{Ax}^{\text{Tg1/+}}$ -Embryo. Im mutierten Embryo ist das ventrale Signal stark reduziert (vergl. Pfeile in c und d).

2.7 Verlust eines zusätzlichen β -Catenin-Allels mildert die phänotypischen Veränderungen der $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Tiere

Um den Einfluss von β -Catenin auf den HPE-Phänotyp auf genetischer Ebene zu untersuchen, wurde die β -Catenin-Menge durch das Einkreuzen eines mutierten β -Catein-Allels (Huelsen et al., 2000) in $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Mäuse vermindert. Bei der Auswertung der Genotypen der Nachkommen, die bis zum Erwachsenenalter überleben, ergibt sich folgende Verteilung:

Genotyp	$Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+};\beta-Cat^{+/+}$	$Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+};\beta-Cat^{lacZ/+}$
Anzahl Nachkommen	Soll ¹ : 32,8 Ist: 3 (9,1%)	Soll ² : 4,3 Ist: 3 (70%)

1 Wert ermittelt aus 29 Verpaarungen mit insgesamt 190 Nachkommen.

2 Wert ermittelt aus 7 Verpaarungen mit insgesamt 48 Nachkommen.

1,2 Da Embryonen beim vollständigen Verlust von Axin früh in der Entwicklung sterben, wurden diese bei der Berechnung des Soll-Wertes ausgeschlossen.

Die Tabelle zeigt, dass über 90% aller Mäuse mit dem Genotyp $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ nicht lebensfähig sind. Die wenigen Überlebenden wurden bisher noch keiner detaillierten Analyse unterzogen. Verpaarungsansätze weisen jedoch darauf hin, dass weder männliche noch weibliche Tiere fertil sind. Im Gegensatz dazu überleben 70% der $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Tiere, wenn ihnen zusätzlich noch ein β -Catenin-Allel ($\beta-Cat^{lacZ/+}$) fehlt. Bislang konnte eines der männlichen Tiere mit dem Genotyp $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+};\beta-Cat^{lacZ/+}$ erfolgreich verpaart werden.

2.8 Gleichzeitiger Verlust von beiden *Conductin*- und *Axin*-Allelen führt zum Absterben der Embryonen vor der Gastrulation

Zur phänotypischen Analyse von Embryonen, denen sowohl *Conductin* als auch *Axin* fehlt, wurden doppelt heterozygot mutierte Mäuse ($Con^{lacZ/+};Ax^{Tg1/+}$) miteinander verpaart. Am Tag 7,5 der Entwicklung konnten nur noch stark deformierte doppelt homozygote Embryonen ohne identifizierbare Struktur isoliert werden (nicht gezeigt). Am Tag 6,5 der Entwicklung fallen beim Vergleich der mutierten mit normal entwickelten Embryonen zunächst die Größenunterschiede ins Auge (Abb. 2.11). So bewirkt der Verlust von *Axin* bei Anwesenheit von *Conductin* (Genotypen $Con^{lacZ/+};Ax^{Tg1/Tg1}$ und $Con^{+/+};Ax^{Tg1/Tg1}$) eine Größenzunahme gegenüber normal entwickelten Embryonen. Dagegen sind Embryonen, bei denen alle vier Allele mutiert sind ($Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/Tg1}$), kleiner als solche, die sowohl *Axin* als auch *Conductin* besitzen. Um die Ausbildung der primären Körperachse in Embryonen mit unterschiedlichen Genotypen zu untersuchen, wurden Transkripte von *Cerberus-like* (*Cer-l*) durch *in situ* Hybridisierung dargestellt. Während *Cer-l* normalerweise anterior exprimiert ist (Abb. 2.10a), zeigen sich bei Verlust von *Axin* zwei Zentren anteriorer Identität (Abb. 2.10b,b'). Offensichtlich bildet sich bei *Axin*-mutierten Embryonen bereits an E6,5 eine sekundäre Körperachse aus. Dagegen zeigen doppelt homozygote Embryonen keine *Cer-l*-Expression (Abb. 2.10c). Während also der Verlust von *Axin* alleine zur Entstehung einer zusätzlichen Achse führt, scheint bei gleichzeitigem Verlust von *Conductin* und *Axin* die Achsenbildung vollständig inhibiert zu sein.

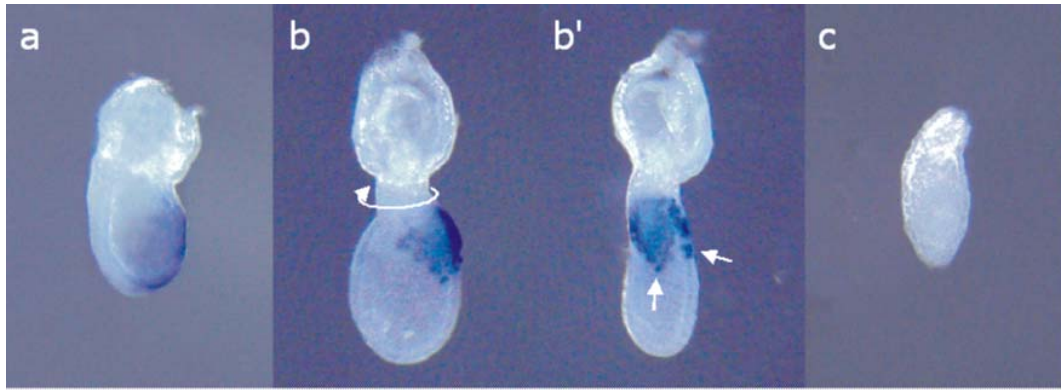


Abb. 2.11: Gleichzeitiger Verlust von Conductin und Axin inhibiert die embryonale anterior-posteriore Achsenbildung. (a) *In situ* Hybridisierung mit *Cer-1* markiert anteriore Identität im wildtypischen Embryo an E6,5. (b,b') Größenzunahme und Ausbildung sekundärer Körperachse beim Verlust von Axin (Pfeile in b', Ansicht in b' um 90° gegenüber b gedreht). (c) Gleichzeitiger Verlust von Conductin und Axin führt zu Wachstumsverzögerung. Die Abwesenheit der *Cer-1*-Expression deutet darauf hin, dass sich keine primäre Körperachse entwickelt.

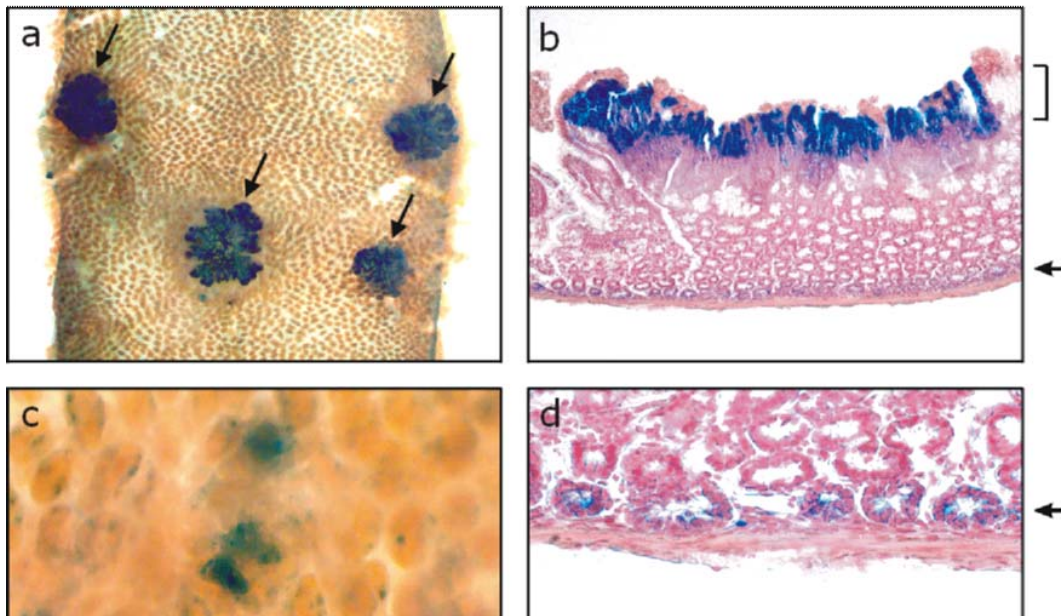


Abb. 2.12: Überexpression von Conductin in Adenomen der ApcMin-Maus. Färbung des Dünndarms von ApcMin/+;ConlacZ/+ Mäusen auf β -Galactosidase-Aktivität. (a) Starke Färbung der Adenome im Lumen des longitudinal geöffneten Darms (Pfeile). (b) Paraffinschnitt eines Adenoms zeigt starke Färbung im Tumor (Klammer) und schwächere Färbung im Epithel der Krypten nahe der Muskelschicht (Pfeil). (c) Färbung früher adenomatöser Läsionen. (d) Vergrößerung der in b mit Pfeil markierten Region.

2.9 Analyse der *Conductin-lacZ*-Expression in intestinalen Adenomen APC-mutierter Mäuse

Eine Reihe von Zelllinien, die aus humanen Tumoren gewonnen wurden, zeigen starke Expression von *Conductin* (Lustig, Jerchow et al., 2002). Insbesondere konnten große *Conductin*-Mengen in Kolonkarzinomzellen mit Mutationen in Genen des Wnt-Signalwegs nachgewiesen werden. Um diesen Befund im Tiermodell zu bestätigen, wurden Apc^{Min} -Mäuse mit *Conductin*-mutierten Tieren verpaart. Apc^{Min} -Mäuse tragen eine Keimbahnmutation im *Apc*-Gen und gelten als Modellsystem für die Entwicklung intestinaler Tumore (Su et al., 1992; Moser et al., 1995a). Wie oben beschrieben exprimieren die *Conductin*-mutierten Mäuse das bakterielle β -Galactosidase-Gen unter der Kontrolle des *Conductin*-Promotors, was den Nachweis der Promotor-Aktivität durch eine einfache Färbereaktion erlaubt. Es wurde der Dünndarm von doppelt heterozygoten Tieren im Alter von mindestens sechs Monaten präpariert, geöffnet und im gesamten auf β -Galactosidase-Aktivität hin gefärbt. Hierbei zeigt sich eine starke tiefblaue Färbung der zahlreichen Adenome, die demnach eine robuste *Conductin*-Expression widerspiegelt (Abb. 2.12a,b). Neben dem starken Signal in den Adenomen werden weitere Signale in kleineren Strukturen beobachtet, bei denen es sich um frühe adenomatöse Läsionen handelt (Abb. 2.12c). Weiterhin zeigen sich Zentren schwacher Expression nahe der den Darm umgebenden Muskulatur, die das normale Expressionsmuster von *Conductin* in den Krypten darstellen (Abb. 2.12d). Zusammen mit den weiteren bei Lustig, Jerchow et al. beschriebenen Ergebnissen stellt *Conductin* also ein direktes Zielgen des Wnt-Signalwegs (Lustig, Jerchow et al., 2002). Das Anschalten einer inhibitorisch wirkenden Komponente wie *Conductin* stellt damit eine negative Rückkopplung innerhalb des Signalwegs dar.

3 Diskussion

In meiner Arbeit habe ich durch die Technik der homologen Rekombination eine Mutation in den *Conductin*-Lokus der Maus eingebracht, die zum Verlust der *Conductin*-Expression in homozygoten Tieren führt. Anhand eines dabei unter der Kontrolle des endogenen *Conductin*-Promotors eingebrachten Reportergens war es möglich, die Expression von *Conductin* während der Embryogenese zu untersuchen. Homozygot mutierte *Con*^{lacZ/lacZ}-Tiere sind lebensfähig und zeigen keine offensichtlichen phänotypischen Veränderungen. Kreuzungen der *Conductin*-mutierten Tiere mit *Axin*-mutierten Mäusen erlaubte eine detaillierte Analyse der genetischen Interaktion der beiden homologen Gene *Conductin* und *Axin*: Sind zwei *Conductin*-Allele und ein *Axin*-Allel mutiert entwickelt sich Holoprosenzephalie, welche die beim Menschen häufigste Form angeborener Vorderhirndefekte darstellt. Bei intaktem *Conductin* führt der Verlust von beiden *Axin*-Allelen, wie bekannt, zur Duplikation der anterior-posterioren Körperachse des Embryos. Sind dagegen gleichzeitig beide *Conductin*- und beide *Axin*-Allele mutiert, so kommt es zu sehr früher Letalität am Tag 6 der Embryonalentwicklung, wobei die anterior-posteriore Körperachse nicht ausgebildet wird. Die vorgestellten Ergebnisse stellen einen Modellfall dafür dar, wie die Funktionen zweier homologer, teilweise redundanter Gene mit genetischen Methoden in der Maus untersucht werden können.

3.1 Holoprosenzephalie in *Con*^{lacZ/lacZ};*Ax*^{Tg1/+}-Mäusen

Der kombinierte Verlust von beiden *Conductin*-Allelen und einem *Axin*-Allel führt zu schweren Missbildungen des Kopfes am Tag 12,5 der Embryogenese. Kraniofaziale Defekte und Fehlbildungen des Gehirns werden bei einem Teil der Embryonen bereits am Tag 10 der Entwicklung sichtbar. Eine kleine Zahl von Embryonen entwickelt sich hingegen weitgehend normal bis zur Geburt, wobei dann jedoch nur sehr wenige nach der Geburt überleben. In den meisten Fällen ist die Fehlentwicklung schon an E12,5 offensichtlich. Es fällt auf, dass lediglich anteriore Kopfstrukturen der Embryonen betroffen sind. Der Rest des Körpers ist zwar kleiner als bei wildtypischen Mäusen, erscheint jedoch normal entwickelt.

Die Fehlbildungen von *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Mäusen gleichen der auch beim Menschen beschriebenen Holoprosenzephalie (HPE). Bei der HPE werden unterschiedlich stark ausgeprägte Defekte rostraler Strukturen beschrieben. Dabei reichen die Fehlbildungen von leichten Mittellinien-Defekten bis zur Fusion der lateralen Ventrikel des Telenzephalons. Diese gehen einher mit der fehlerhaften Ausbildung rostraler kraniofazialer Strukturen und der Augen (vergl. Einleitung, Kapitel 1.8). Genauso wie bei *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Mäusen kommt es auch beim Menschen nur in besonders schweren Fällen zum vollständigen Verlust der Augen und des Telenzephalons. Dabei ist das Dienzephalon nur schwach betroffen.

Beim Menschen sind im Zusammenhang mit HPE diejenigen Mutationen am besten charakterisiert, die den Sonic Hedgehog (Shh)-Signalweg betreffen. So tragen zwar nur rund 7% aller von HPE betroffenen Patienten eine *Shh*-Mutation; werden jedoch Familien untersucht, bei denen HPE autosomal dominant vererbt wird, so findet sich in rund 23% der Fälle eine Mutation im *Shh*-Gen (Wallis and Muenke, 2000). Dazu kommen noch Mutationen im *Patched1* (*Ptc1*)-Gen, welches für den Rezeptor von Shh kodiert (Ming et al., 2002) und in *Gli2*, dem Gen für einen Transkriptionsfaktor der Shh-Signalkaskade (Ming and Muenke, 2002). Alle weiteren beschriebenen Mutationen lassen sich zumindest theoretisch mit dem Shh-Signalweg in Verbindung bringen (vergl. Einleitung, Kapitel 1.8), wenn auch der direkte Zusammenhang zwischen der Mutation, dem Shh-Signalweg und dem Auftreten der HPE noch nicht auf molekularer Ebene nachgewiesen werden konnte.

Bislang wurde der Wnt-Signalweg über Mutationen im *Zic2*-Gen mit HPE in Zusammenhang gebracht. Die Zinkfinger Transkriptionsfaktoren *Zic1-4* sind homolog zu *Drosophila* *Odd-paired* (*Opa*; Aruga et al., 1996a; Aruga et al., 1996b) und zu dem Zebrafisch-Gen *Odd-paired like* (*Opl*; Grinblat et al., 1998). In *Drosophila* hat Opa die Aufgabe, *En* und *Wg* in ihrer Funktion im Hedgehog (Hh)-Signalweg zum richtigen Zeitpunkt zu aktivieren (Benedyk et al., 1994). *Opa/Opl*-Expression wird in der Fliege und im Zebrafisch durch Decapentaplegic (Dpp) bzw. BMP4 negativ reguliert (Cimborra and Sakonju, 1995; Grinblat et al., 1998). In *Xenopus* regelt *Zic2* zusammen mit *Gli* die Differenzierung spezifischer neuraler Zellpopulationen (Brewster et al., 1998). Zusammengenommen ist also nur in *Drosophila* eine Verbindung von Wnt/wg zu *Zic/opa* beschrieben worden. Dazu kommt, dass opa als

Aktivator von *wg* und *en* beschrieben wurde, im Säuger (Mensch und Maus) jedoch der Verlust der Zic2-Funktion als Ursache für HPE identifiziert worden ist (Brown et al., 1998; Nagai et al., 2000). Insofern beschreibt die vorliegende Arbeit das erste Beispiel für Mutationen, die über eine ektopische Aktivierung des Wnt-Signalwegs zum Phänotyp der HPE führen.

Dagegen besteht bei den hier charakterisierten *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Mäusen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Reduktion der Gerüstproteine Conductin und Axin, welche im Wnt-Signalweg wirken und dem Shh-Signalweg. So zeigt sich an E10,5 deutlich der Verlust der *Shh*-Expression in der *anterioren entopedunkularen Zone* (AEZ). Die Tatsache, dass die Bereiche ventraler und dorsaler *Fgf8*-Expression in *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen näher beieinander liegen, als dies in wildtypischen Embryonen der Fall ist, weist darauf hin, dass möglicherweise eine Struktur im ventralen anterioren Dienzephalon fehlt. Bislang ist jedoch unklar, ob die AEZ selbst abwesend ist oder ob dort *Shh* nicht mehr exprimiert wird.

Interessanterweise ist die HPE bei *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen verschieden stark ausgeprägt. So finden sich Embryonen mit besonders starken Fehlbildungen: Das Telenzephalon und die Augen haben sich in der Entwicklung nicht aus dem Prosenzephalon ausgestülpt. Die Tiere besitzen daher nur ein einziges, zentrales Vorderhirnventrikel. Dies geht einher mit starken fazialen Entwicklungsstörungen. In diesem Fall spricht man von einer alobären HPE. Daneben treten Fälle der semilobären HPE auf. Hierbei sind die Ventrikel des Telenzephalons angelegt, jedoch teilweise fusioniert. Starke faziale Fehlbildungen und unvollständige Entwicklung der Augen stehen meist im Zusammenhang mit dieser Form der HPE. Auch Formen der lobären HPE sind zu beobachten: Die Mäuse sind weitestgehend normal entwickelt, tragen jedoch Defekte in rostralen Mittellinienstrukturen. Wenige dieser Mäuse überleben, wurden jedoch bislang nicht im Detail analysiert. Die unterschiedliche Ausprägung des Phänotyps bei gleichem Genotyp ist auch bei der HPE des Menschen beschrieben worden: In Familien mit Mutationen, die ein Allel des *Shh*-Gens inaktivieren, entwickeln nur 50% der Träger der Mutation HPE. So wurde dieselbe *Shh*-Mutation in Familienmitgliedern mit ausgeprägter HPE (alobäre und semilobäre HPE), mit Mikroformen der HPE (lobäre HPE mit subtilen Mittelliniendefekten wie beispielsweise zu geringem Augenabstand [Hypotelorismus] oder Verengung der

hinteren Nasenöffnung [Choanalstenose]) und bei symptomfreien Familienmitgliedern gefunden (Roessler et al., 1996).

3.2 Entstehung von Oligodendrozyten wird anscheinend durch ektopisches Wnt-Signal unterdrückt

Die anteriore entopedunkuläre Zone (AEZ) wurde mit der Genese von Oligodendrozyten in Verbindung gebracht. Hierbei handelt es sich um die myelinbildenden Zellen des Zentralnervensystems (ZNS). Vorläufer dieser Zellen entstehen sowohl im Neuralrohr als auch im Gehirn ab dem Tag 9 der murinen Embryonalentwicklung (Spassky et al., 2001). Während die Zellen im Hinter-, Mittel- und kaudalen Vorderhirn einen basoventralen Ursprung haben, entwickeln sie sich im rostralen Vorderhirn aus der im alaren Bereich gelegenen AEZ. Aus der AEZ wandern sie im weiteren Verlauf der Entwicklung in einer tangentialen Bewegung aus, um das gesamte Telenzephalon zu bevölkern. Hierbei wandern die Vorläuferzellen im Vorderhirn über weite Strecken, während Vorläuferzellen aus weiter kaudal gelegenen Regionen in einer radialen Bewegung nur kurze Distanzen überwinden (Olivier et al., 2001). Entlang der rostrokaudalen Achse ist die Entwicklung von Oligodendrozyten eng mit dem Expressionsmuster von *Shh* verknüpft. So zeigt sich im Gehirn überlappende oder benachbarte Expression des myelin-assoziierten *Plp*-Gens, welches als Marker-Gen für entstehende Oligodendrozyten gilt. Sowohl *Shh* wie auch *Plp* sind in der AEZ exprimiert. Werden basale oder rostrale Bereiche des Telenzephalons explantiert, so kann die Differenzierung von Oligodendrozyten durch blockierende Antikörper gegen *Shh* inhibiert werden (Spassky et al., 2001). Weiterhin konnte eine Beteiligung von Oligodendrozyten an der Entwicklung der Augen nachgewiesen werden (Ono et al., 1997).

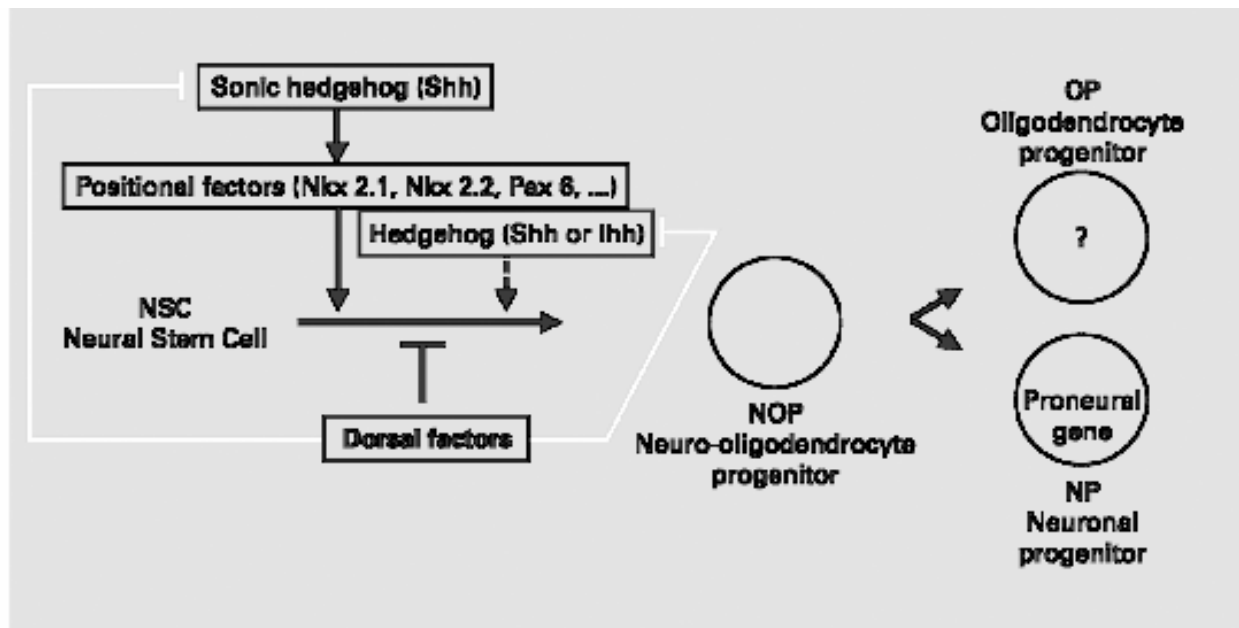


Abb. 3.1: Die Entwicklung von Oligodendrozyten wird durch Shh stimuliert und durch dorsale Faktoren inhibiert. Sowohl im Neuralrohr wie auch im Vorderhirn wird die Differenzierung von neuronalen Stammzellen (NSC) zu Neuro-Oligodendrozyten-Vorläufern (NOP) durch Shh stimuliert. Diesem Prozess wirken dorsale Faktoren entgegen. Die mögliche Inhibition von Shh durch den Wnt-Signalweg ist durch weiße Linien dargestellt (Schema modifiziert nach Spassky et al., 2001).

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass die Expression von *Shh* essentiell für die Entwicklung von Oligodendrozyten ist. Speziell in der AEZ ist die Expression von *Shh* für die Entwicklung des Telenzephalons und der Augen notwendig. Es ist gezeigt worden, dass Faktoren, wie unter anderem Shh, aus dem ventralen Neuralrohr die Genese von Oligodendrozyten stimulieren. Dagegen wirken Faktoren aus dem dorsalen Neuralrohr inhibitorisch auf die Entwicklung von Oligodendrozyten. Dabei gehört BMP4 jedoch nicht zu diesen Faktoren (Wada et al., 2000). Wie diese Autoren im Weiteren zeigen, bewirken die dorsalisierenden Faktoren eine Abnahme der Proliferation im ventralen Bereich. Dies ist ein Effekt, der auch in *Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen zu beobachten ist, in denen im ventralen Telenzephalon die Proliferationsrate gegenüber wildtypischen Embryonen vermindert ist. Wnt-Liganden sind als dorsalisierende Agenzien im ZNS bekannt und auch im dorsalen Neuralrohr exprimiert. Sie könnten daher also die gesuchten inhibitorisch wirkenden Faktoren sein. Man kann annehmen, dass die Signalmechanismen im Vorderhirn denen im Neuralrohr gleichen. Weiterhin könnte in den *Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen eine

durch den Verlust von drei Allelen der zentralen Gerüstproteine bewirkte lokale Überaktivierung des Wnt-Signalwegs stattfinden. Diese Überaktivierung wirkte dann als das dorsalisierende Signal. Durch die ektopische Aktivierung von Zielgenen würden Mechanismen in Kraft gesetzt, die entweder selbst die Entstehung von Oligodendrozyten inhibieren oder die Expression ventraler Gene wie *Shh* negativ regulieren, die für die Entwicklung von Oligodendrozyten notwendig sind (Abb.3.1). Dabei würden unterschiedliche Gewebe möglicherweise verschieden auf die erhöhte Aktivität von Wnt-Zielgenen reagieren. Während das von einem *Axin*-Allel synthetisierte Axin-Protein im Neuralrohr offensichtlich ausreicht, um die Wnt-Signalweg-Aktivität unter eine bestimmte Schwelle zu drücken, liegt die entsprechende Schwelle im Vorderhirn anscheinend niedriger. Dies könnte beispielsweise durch den größeren Abstand zwischen ventralen und dorsalen Strukturen im Vorderhirn begründet sein, die ein feineres Reagieren ventraler und lateraler Strukturen auf den Wnt-Signalweg nötig machten. Wird nun wiederum die Menge an β -Catenin reduziert, ist das System in der Lage, zytoplasmatische β -Catenin-Mengen richtig einzustellen. Dies wird dadurch belegt, dass der Anteil überlebender *Con*^{lacZ/lacZ};*Ax*^{Tg1/+}-Mäuse viel größer ist, wenn diese zusätzlich ein β -Catenin-Allel verloren haben (siehe auch nächstes Kapitel). Ein Ansatzpunkt zukünftiger Untersuchungen wird demnach das Schicksal von Oligodendrozyten in *Con*^{lacZ/lacZ};*Ax*^{Tg1/+}-Embryonen sein. Dabei muss auch geklärt werden, ob die AEZ als Signalzentrum abwesend ist oder ob die Struktur zwar ausgebildet, aber kein Shh-Signal mehr generiert wird.

3.3 Verlust eines β -Catenin-Allels vermindert HPE-Phänotyp

Die ektopische Aktivierung des Wnt-Signalwegs oder eine Stabilisierung von β -Catenin konnte in den *Con*^{lacZ/lacZ};*Ax*^{Tg1/+}-Embryonen nicht direkt nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Daher bleibt die Frage offen, ob in *Con*^{lacZ/lacZ};*Ax*^{Tg1/+}-Embryonen tatsächlich der β -Catenin-Abbaukomplex entscheidend gestört ist. Ebenso wäre es möglich, dass andere, bisher nicht bekannte Mechanismen, an denen Conductin und Axin beteiligt sind, in den mutierten Embryonen dereguliert sind.

Einen klaren Hinweis auf den Zusammenhang zwischen der HPE der *Con*^{lacZ/lacZ};*Ax*^{Tg1/+}-Mäuse und dem verminderten β -Catenin-Abbau – und damit dem

Wnt-Signalweg – liefert ein hier ausgeführtes genetisches Experiment: *Conductin/Axin*-mutierte Tiere wurden mit solchen verpaart, die eine inaktivierende Mutation im β -*Catenin*-Gen tragen (Huelsken et al., 2000). Hierbei zeigt sich, dass ein großer Anteil (70%) der *Cor*^{lacZ/lacZ};*Ax*^{Tg1/+}-Mäusen mit einem mutierten β -*Catenin*-Allel überlebt, wogegen nur wenige (9,1%) überleben, wenn beide β -*Catenin*-Allele intakt sind. Die in der Maus beobachteten Effekte decken sich mit Ergebnissen, die bei der Augenentwicklung von *Drosophila* beschrieben wurden (Ahmed et al., 1998): APC ist in *Drosophila* genauso wie in Vertebraten notwendig, um zytoplasmatische Mengen des β -Catenin-Homologen Armadillo (Arm) zu regulieren (vergl. Einleitung). Trotzdem können in *APC*-mutierten Photorezeptorzellen der Fliege keine Änderungen in Verteilung und Konzentration von Arm nachgewiesen werden. Während aber der Verlust von APC zum Absterben aller Neuronen in allen Ommatidien (Einzelaugen) führt, überleben viele Neuronen, wenn ein wildtypisches *Arm*-Allel durch das nicht funktionelle *Arm*^{YD35}-Allel ersetzt wird (Peifer and Wieschaus, 1990; Wieschaus et al., 1984). Den entgegen gesetzten Effekt hat die Überexpression von *Arm* in Photorezeptorzellen, die zu sehr ähnlichen Defekten führt, wie der Verlust von APC.

In Verbindung mit den Daten aus der Fliege zeigt sich, dass die Konzentration von freiem β -Catenin in der Zelle maßgeblich für deren Reaktion ist. Anscheinend wird in *Cor*^{lacZ/lacZ};*Ax*^{Tg1/+}-Embryonen in einem spezifischen Kontext eine falsche zelluläre Antwort ausgelöst, die schließlich zum beobachteten Phänotyp führt. Die Ursache hierfür scheint das alleinige Vorhandensein eines Axin-Allels zu sein, welches nicht ausreicht, um β -Catenin in dem betreffenden Kontext genügend zu reduzieren. Die zusätzliche Abwesenheit eines β -*Catenin*-Allels bewirkt eine grundsätzliche Verminderung der β -Catenin-Menge, so dass das verbleibende β -Catenin weitestgehend normal durch das eine verbliebene *Axin*-Allel reguliert werden kann. Damit zeigt sich, dass die Defekte der *Cor*^{lacZ/lacZ};*Ax*^{Tg1/+}-Mäuse auf einen deregulierten Wnt-Signalweg zurückgehen und nicht in anderen Funktionen von Conductin und Axin zu suchen sind.

3.4 Der $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ -Phänotyp unterscheidet sich von Defekten, die auf fehlerhafter Kopfinduktion beruhen

In der Literatur finden sich mehrere Beispiele, in denen der Wnt-Signalweg mit anterioren Fehlbildungen in Zusammenhang gebracht worden ist. So zeigt die *Headless*-Mutation im Zebrafisch den Verlust der Augen, des Vorderhirns und von Teilen des Mittelhirns (Kim et al., 2000). *Headless* kodiert für das Zebrafisch-Homologe *TCF3*, einem Transkriptionsfaktor aus der LEF/TCF-Familie, der zusammen mit β -Catenin die Transkription von Wnt-Zielgenen aktivieren kann (Behrens et al., 1996; Molenaar et al., 1996). Es ist jedoch bekannt, dass TCF zusammen mit Groucho und/oder CtBP auch als Repressor wirken kann (Cavallo et al., 1998; Roose et al., 1998; Brannon et al., 1999). Kim et al. schlagen vor, dass der Verlust von *Headless* im Fisch zu einer Derepression von Wnt-Zielgenen führt. Die daraus resultierende ektopische Aktivierung von Wnt-Zielgenen während der Gastrulation würde dann die Kopfinduktion stören, bei der der Wnt-Signalweg inhibiert werden muss. Die frühen Störungen in der Kopfentwicklung weisen diese Autoren unter anderem mit der reduzierten Expression des anterioren Markers *Anf* (homolog zu *Hesx1*) und der rostralen Expansion der *Engrailed2*-Expression nach, welche normalerweise die Grenze zwischen Mes- und Metenzephalon (Midbrain-Hindbrain Boundary, MHB) markiert.

Im Gegensatz dazu sind die anterioren Markergene *Hesx1* und *Otx2* in Mäusen mit dem Genotyp $Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}$ korrekt exprimiert, und der MHB-Marker *Engrailed1* (*En1*) zeigt keine rostrale Expansion. Dies bedeutet, dass bei dem in dieser Arbeit beschriebenen kraniofazialen Phänotyp, im Gegensatz zur *Headless*-Mutation, die Kopfentwicklung während der Gastrulation korrekt induziert wird. Das heißt gleichzeitig, dass die beobachteten Defekte zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt verursacht werden, und dass die korrekte Regulation des Wnt-Signalwegs nach der Induktion des Kopfes weiterhin eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung rostraler Strukturen spielt.

Neben *Headless* zeigt auch die *Masterblind*-Mutation im Zebrafisch Störungen bei der Kopfinduktion (Heisenberg et al., 2001; van de Water et al., 2001). Interessanterweise handelt es sich hierbei um eine Mutation im Zebrafisch *Axin*-Gen.

Dabei ist durch eine Punktmutation das in der GSK3 β -Bindungsstelle gelegene konservierte Leucin³⁹⁹ zu Glutamin mutiert. Das daraus resultierende mutierte Axin-Protein kann nicht mehr an GSK3 β binden. Damit wirkt es dominant-negativ, in dem es die Kinase GSK3 β , die essentiell für die Phosphorylierung und den daraus folgenden Abbau von β -Catenin ist, aus dem β -Catenin-Abbaukomplex verdrängt. Die dadurch verursachte Stabilisierung von zytoplasmatischem β -Catenin bewirkt in der Folge eine ektopische Aktivierung von Zielgenen des Wnt-Signalwegs. Aus diesem Grund weist *Masterblind* einen der *Headless*-Mutation sehr ähnlichen Phänotyp auf, bei dem der Kopf nicht richtig induziert wird. Ganz anders als bei *Masterblind* wird der Phänotyp der *Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Mäuse nicht durch eine dominant-negative Mutation hervorgerufen. Vielmehr wird hier durch das Ausschalten beider *Conductin*-Allele und eines *Axin*-Allels die Menge des Gerüstproteins so weit vermindert, dass es zwar seine Aufgaben in der frühen Embryonalentwicklung und bei der Kopfinduktion wahrnehmen kann, zu einem späteren Zeitpunkt jedoch offensichtlich nicht mehr ausreicht, um zytoplasmatische β -Catenin-Mengen ausreichend zu kontrollieren. Aufgrund der Art der Mutation und der Tatsache, dass der Fisch zudem über zwei funktionelle *Conductin*-Allele verfügt, bilden sich im *Masterblind*-Fisch und in *Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Mäusen zwei vollständig unterschiedliche Phänotypen aus, die auf einer Fehlregulation des Wnt-Signalwegs zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung beruhen und damit nicht miteinander vergleichbar sind.

Eine Analogie zu den Zebrafisch-Mutationen *Headless* und *Masterblind* findet sich bei der *Dickkopf1* (*Dkk1*)-Mutation: Die vollständige Abwesenheit des Wnt-Inhibitors Dkk1 in der Maus bewirkt den Verlust von Kopfstrukturen anterior zum Mesenzephalon (Mukhopadhyay et al., 2001). Anscheinend wird in Abwesenheit von Dkk1 der Wnt-Signalweg bei der Kopfinduktion nicht inhibiert. Aus diesem Grund werden anteriore Strukturen nicht angelegt. Im Vergleich zu *Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen an E8,5 fällt auf, dass bei *Dkk1^{-/-}*-Embryonen die Expression des anterioren Markers *Hesx1* – wie bei der *Headless*- und *Masterblind*-Mutation im Zebrafisch – vollständig fehlt. Weiterhin ist der Kopf von *Dkk1^{-/-}*-Embryonen bereits an E11,5 extrem deformiert und Di- und Telenzephalon sind vollständig abwesend. Dagegen besitzen *Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Embryonen stets ein Dienzephalon und meist auch Reste eines Telenzephalons.

3.5 Die Funktion von Conductin in der frühen Embryogenese kann von Axin übernommen werden

Überraschenderweise bewirkt der Verlust von Conductin allein bei der Maus keine offensichtliche phänotypische Veränderung. In allen *in vitro* durchgeführten Experimenten konnten bisher keine Unterschiede zwischen Conductin und Axin herausgearbeitet werden (Behrens, Jerchow et al., 1998; Hart et al., 1998; Ikeda et al., 1998; Kawahara et al., 2000; Kishida et al., 1998; Nakamura et al., 1998). Im Weiteren zeigt ein Blick auf das Expressionsmuster von *Axin* eine ubiquitäre Verteilung der Transkripte. Schon im Blastozystenstadium sind *Axin*-Transkripte nachweisbar, und die Expression hält während der gesamten Embryogenese und im adulten Tier an (Zeng et al., 1997). Dagegen ist *Conductin* erst ab E6,5 exprimiert, zeigt sich dann zunächst posterior, um schließlich ab E9,5 gleichfalls ubiquitär exprimiert zu sein. Allerdings ist *Axin* sehr homogen exprimiert, während *Conductin* Bereiche unterschiedlich starker Expression zeigt. Die funktionelle Redundanz und die ubiquitäre Expression ermöglichen es Axin also, die Rolle von Conductin in der Entwicklung zu übernehmen. Wie die Fehlentwicklung der Axin-mutierten Embryonen zeigt ist das Umgekehrte jedoch nicht der Fall. Es bleibt am Ende also die Frage nach dem physiologischen Nutzen von Conductin, d.h. warum es zwei homologe Proteine gibt, wenn doch auf eines anscheinend verzichtet werden kann. Dieser Punkt soll unten diskutiert werden.

3.6 In der frühen Embryonalentwicklung kann Conductin die Funktion von Axin übernehmen

Die vollständige Abwesenheit von Conductin und Axin in *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/Tg1}*-Embryonen führt früh in der Embryogenese (E6) dazu, dass die Entwicklung eingestellt wird. Interessanterweise bilden die Embryonen nicht, wie man bei einer frühen Stabilisierung von β -Catenin annehmen könnte, sekundäre Körperachsen aus. Wie die Abwesenheit des anterioren Markers *Cerberus-like* (*Cer-1*) zeigt, schlägt vielmehr die Ausbildung der anterior-posterioren Achse vollständig fehl. Morphologisch gleichen die Embryonen solchen, die homozygot die *Apc^{Min}*-Mutation tragen (Moser et al., 1995b). Die *Apc^{Min/Min}*-Embryonen sind bislang allerdings phänotypisch nur unzureichend charakterisiert, scheinen aber wie *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/Tg1}*-Embryonen

nach dem Tag 6,5 der Entwicklung zu sterben und sind in diesem Stadium deutlich kleiner als wildtypische oder heterozygot mutierte Embryonen aus demselben Wurf.

In der frühen Embryonalentwicklung vor der Gastrulation kann *Conductin* offensichtlich den Verlust von Axin kompensieren. Bei Anwesenheit von *Conductin* entwickeln sich die Embryonen nämlich über E6,5 hinaus. Dabei führt der Verlust von Axin zu einem Ergebnis, das gut zu einer ektopischen Aktivierung des Wnt-Signalwegs passt: Die Stabilisierung von zytoplasmatischem β -Catenin induziert eine sekundäre Körperachse. In ähnlicher Weise ist dies von *Xenopus*-Embryonen her bekannt: Hier induziert die ventrale mRNA-Injektion von Komponenten, die den Wnt-Signalweg aktivieren, die Ausbildung einer sekundären dorsalen Achse. Dabei kann sich im Frosch eine komplette zweite Achse mit Gehirn, Augen etc. entwickeln (Sokol et al., 1991; Behrens et al., 1998; De Robertis et al., 2000). Dagegen leiden Axin-mutierte Maus-Embryonen unter einer Reihe von Fehlbildungen (Perry et al., 1995; Zeng et al., 1997). Die sekundäre Achse kann lediglich anhand der Expression von Markergenen nachgewiesen werden, und die Embryonen sterben zwischen E8 und E10 ab.

Es ist bemerkenswert, dass *Conductin* im wildtypischen Embryo vor E6,5 nicht exprimiert ist. Dennoch zeigen sich zu diesem Zeitpunkt grundlegende Unterschiede im Phänotyp von Axin^{Tg1/Tg1}-Embryonen mit und ohne *Conductin*. Nach dem Verlust von Axin kommt es also anscheinend zu einer vorzeitigen Aktivierung der *Conductin*-Expression, die es dem frühen Embryo erlaubt, sich über E6,5 hinaus zu entwickeln. Dabei kann *Conductin* jedoch nicht alle Aufgaben von Axin übernehmen, wie die zu diesem Zeitpunkt bereits erfolgte Duplizierung der Körperachse veranschaulicht.

3.7 *Conductin* als „Rettungsanker“ im Wnt-Signalweg

Conductin ist in humanen Leber- und Kolontumoren im Vergleich zum umgebenden Gewebe stark exprimiert. Auch in Darmtumoren des Modellsystems der Apc^{Min}x*Conductin*^{lacZ}-Maus zeigt sich eine extreme Zunahme der Expression des β -Galactosidase-Transgens, welches unter der Kontrolle des *Conductin*-Promotors steht. *In vitro* lässt sich die Expression von *Conductin* durch eine dominant-negative Form von TCF reduzieren, während zugesetzter Wnt-Ligand die Expression von *Conductin* stimuliert. Dieser Stimulation geht eine Stabilisierung von β -Catenin voraus

(Lustig, Jerchow et al., 2002). Weiterhin konnten im *Conductin*-Promotor acht LEF/TCF-Bindungsstellen identifiziert werden (Jho et al., 2002). *Conductin* ist also selbst ein Zielgen des Wnt-Signalwegs.

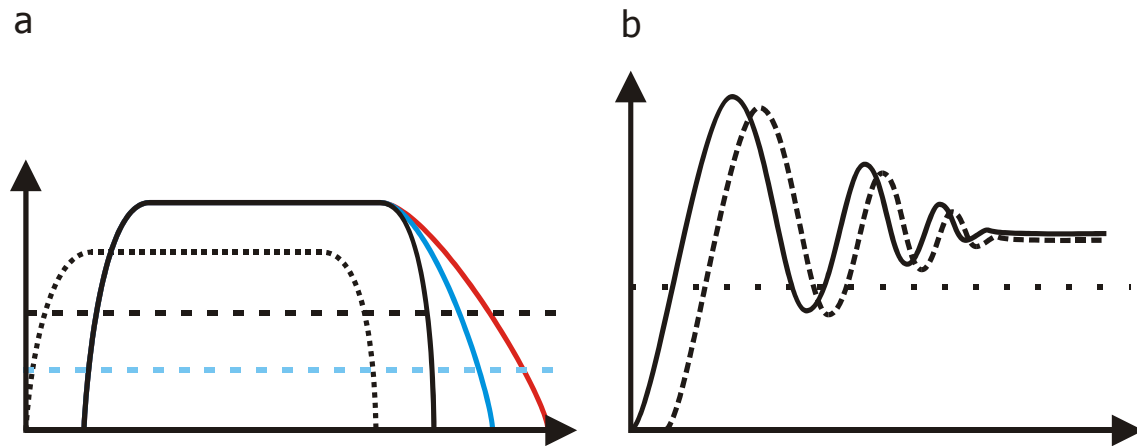


Abb. 3.2: Aktivität des Wnt-Signalwegs beim Verlust von Conductin und/oder Axin. (a) Ein extrazellulärer Wnt-Ligand (punktierte Kurve) induziert ein zelluläres Wnt-Signal (durchgezogene Kurve). Beim Verlust von Conductin oder einem Axin-Allel vermindert sich die Signalaktivität nach dem Wegfall des Wnt-Liganden weniger schnell (blaue Kurve). Fehlt Conductin gemeinsam mit einem Axin-Allel, so verlangsamt sich der Abfall des Wnt-Signals nochmals (rote Kurve). Axin-Mengen sind durch die gestrichelte Kurve wiedergegeben (schwarz: 2 Allele, blau: 1 Allel). (b) Bei Abwesenheit von Axin induziert das Wnt-Signal (durchgezogene Kurve) die Expression von Conductin (gestrichelte Kurve). Conductin inhibiert das Signal, wird jedoch bei dessen Abnahme selbst weniger exprimiert. Aktivität des Signalwegs und Expression von Conductin pendeln sich auf einem mittleren Wert ein. Dieser ist über der Grenze, die für die Induktion einer sekundären Körperachse notwendig ist (punktierte Linie).

Die Möglichkeit des Wnt-Signalwegs, die Expression einer Komponente zu stimulieren, die die Signalübertragung dämpft, etabliert einen negativen Rückkopplungsmechanismus. Diese negative Rückkopplung könnte dazu dienen, die Abnahme der Konzentration extrazellulärer Wnt-Liganden schnell in die Abschaltung des Signalwegs umzusetzen: Ist das Signal aktiv, so ist GSK3 β inaktiv, β -Catenin wird nicht abgebaut, akkumuliert und treibt die Transkription von Zielgenen. Da *Conductin* selbst ein Zielgen ist, reichert es sich in der Zelle an. Solange GSK3 β inaktiv ist, führt dies jedoch nicht zum Abbau von β -Catenin. Endet das extrazelluläre Wnt-Signal, so stehen große Mengen Conductin bereit, die zusammen mit konstanten Axin-Mengen den Abbau von β -Catenin induzieren können. Fehlt Conductin, so reicht Axin aus, um

β -Catenin schnell genug abzubauen. Fehlt zusätzlich ein Axin-Allel, so wird dem Modell zufolge die Aktivität des Signalweges wesentlich langsamer reduziert (Abb. 3.2a). In der Entwicklung rostraler Strukturen bewirkt diese Deregulation offensichtlich den beobachteten Phänotyp der *Con^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Mäuse.

Früh in der Entwicklung dämpft Conductin bei Abwesenheit von Axin das Wnt-Signal. Die Expression von Conductin wird durch den Signalweg induziert, inhibiert das Signal, was wiederum zu einer Reduktion in der Conductin-Expression führt. Aktivität des Wnt-Signalwegs und Conductin-Expression pendeln sich auf einem mittleren Wert ein. Dieser ist niedrig genug, um die Entwicklung des Embryos über Tag 6,5 hinaus zuzulassen, ist aber so hoch, dass eine sekundäre Körperachse induziert wird (Abb. 3.2b).

Unter den gegebenen Haltungsbedingungen zeigt der Verlust von Conductin keinen offensichtlichen Phänotyp. In seiner Funktion innerhalb des negativen Rückkopplungsmechanismus ist Conductin dazu in der Lage, ein schnelles Abschalten des Wnt-Signalwegs zu gewährleisten. Möglicherweise kann es auch verhindern, dass der Signalweg überreagiert. Exogene Einflüsse könnten bewirken, dass eine Zelle versehentlich zu stark reagiert. Dann wird neben anderen Zielgenen auch die Expression von *Conductin* verstärkt, welches in der Lage ist, das Signal einzudämmen. Tatsächlich zeigt sich in der frühen Embryonalentwicklung beim Verlust von Axin das Wirken von Conductin zu einem Zeitpunkt, an dem es im wildtypischen Embryo noch nicht exprimiert ist. Wahrscheinlich führt also die durch den Verlust von Axin induzierte Überaktivität des Wnt-Signalwegs zur Expression von *Conductin*, welches der Signalaktivität entgegenwirken kann. Beim Verlust von einem *Axin*-Allel entwickelt sich die Maus normal. In Situationen, in denen von einem Allel nicht genügend Transkripte generiert werden, um ausreichend Axin-Protein zu synthetisieren, springt Conductin ein, um das Wnt-Signal zu inhibieren. Fehlt Conductin in diesem Zusammenhang, wird β -Catenin nicht schnell genug abgebaut und es kommt zur HPE.

In freier Natur ist der Organismus in allen Entwicklungsstufen vor andere Herausforderungen gestellt, als dies bei der kontrollierten Haltung von Mäusen unter Laborbedingungen der Fall ist. Hier verschafft die Anwesenheit der beiden

homologen Proteine Conductin und Axin anscheinend einen Überlebensvorteil. Worauf dieser beruht konnte jedoch bisher nicht geklärt werden. Die Abwesenheit eines *offensichtlichen* Phänotyps bedeutet weiterhin, dass es möglicherweise sehr wohl zu Defekten kommt. Diese konnten von mir bisher nicht identifiziert werden. Das Auftreten von HPE in *Cor^{lacZ/lacZ};Ax^{Tg1/+}*-Mäusen legt beispielsweise nahe, dass vielleicht auch *Cor^{lacZ/lacZ}*-Mäuse subtile neurologische Defekte entwickeln, die mit den angewandten Verfahren in Tierexperimenten nicht analysiert werden konnten.

4 Material und Methoden

Alle erwähnten, jedoch nicht näher beschriebenen molekularbiologischen Standardmethoden wie z.B. Plasmid-DNA Präparation in analytischem Maßstab, Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung linearisierter DNA, Auffüllen überstehender DNA-Enden, Ligation von DNA-Molekülen, Transformation von Bakterien, RNA-Präparation, Auftrennung von Nukleinsäuren über Agarosegele, Kapillartransfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulosemembranen und Hybridisierung von membranfixierten Nukleinsäuren mit radioaktiven DNA-Proben („Southern“- und „Northern-Blot“) wurden aus den Laborhandbüchern von Sambrook et al. (1989) und Davis et al. (1986) übernommen. Nach Herstellerangaben wurden durchgeführt: Plasmid-DNA Präparationen in quantitativem Maßstab (QIAGEN, Diagen), Elution von DNA aus Agarosegelen (Jetsorb, Genomed), radioaktive Markierung von DNA („Megaprime DNA labelling system“, Amersham), DNA-Sequenzierungen (IRD-fluoreszent: „Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit“, Amersham, mit DNA-Sequencer 4000L, MWG-Biotech), Präparation von polyA-RNA („mRNA-purification-kit“, Pharmacia).

4.1 Mutagenese durch Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur Mutagenese, d.h. zum Einführen von Restriktionsschnittstellen, benutzt. In einem 100 µl Ansatz waren 1 bis 10 ng der Ausgangs-DNA, 250 µM dNTPs, jeweils 50 pmol von jedem „Primer“, 2,5 U Pfu DNA-Polymerase (Stratagene) und 1x Reaktionspuffer (Stratagene) enthalten. Die Reaktion wurde in einem programmierbaren Thermoblock (Biometra TRIO) mit folgendem Programm durchgeführt: Nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 5 min wurden 30 Zyklen von jeweils 1 min Denaturierung bei 95°C, 1 min Hybridisierung der „Primer“ bei der jeweiligen Schmelztemperatur und 1 bis 3 min Elongation bei 72°C durchgeführt. Anschließend wurde die wässrige Phase des Ansatzes abgenommen, nach Zugabe von $\frac{1}{2}$ Vol. 5 M Ammoniumacetat einmal mit Phenol/Chloroform (1:1) und einmal mit Chloroform extrahiert und die DNA durch

Zugabe von Ethanol gefällt. Alle aus PCR-Amplifikationen hervorgegangenen DNA-Fragmente wurden durch Sequenzierung überprüft.

4.2 Gentechnische Arbeiten in Bakterien

Für sämtliche Arbeiten im bakteriellen System wurde der Vektor pBluescript II SK⁺ (Stratagene) eingesetzt. Dabei wurde der Bakterienstamm XL1 Blue (*F'*, *Tn10* (*tet^r*), *proAB⁺*, *lacI^q*, Δ (*lacZ*)M15, *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *relA1*, *gyrA96*) verwendet.

4.3 Kultur, Transfektion und Selektion von Zellen

Embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) der Linie E14.1 aus der inneren Zellmasse einer männlichen Blastozyste der Mauslinie 129/Ola (Hooper et al., 1987; Kuhn et al., 1991) wurden in DMEM (Gibco) supplementiert mit 4500 mg/l Glukose, 15% fetalem Kälberserum (Sigma), 100 µg/ml Streptomycin, 100 µg/ml Penicillin, 1% nichtessentiellen Aminosäuren, 1% L-Glutamin, 100µM β-Mercaptoethanol und 500 U/ml LIF (Boehringer) kultiviert; diese Kultur erfolgte als Kokultur mit wachstumsinaktivierten embryonalen Fibroblasten. Neomycin-resistente embryonale Fibroblasten wurden aus E16,5 Mausembryonen der Plakoglobin „Knock-out“-Linie (zur Verfügung gestellt von P. Ruiz, Berlin; Ruiz et al., 1996) gewonnen, indem der Kopf und die inneren Organe der Embryonen verworfen, der Rest des Körpers zerkleinert und die Zellen durch wiederholte Behandlung mit Dispasepuffer (5 U/ml Dispase, 3000 U/ml DNaseI und 0,005% Trypsin in PBS) vereinzelt wurden. Diese Zellen wurden in DMEM (Gibco, supplementiert wie zuvor für ES-Zellen angegeben, jedoch ohne LIF) über insgesamt fünf Passagen kultiviert und anschließend durch Behandlung mit 10 µg/ml MitomycinC (Sigma) wachstumsinaktiviert, um für die Kokultur mit ES-Zellen eingesetzt zu werden.

Alle Zellen wuchsen bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 7,5% CO₂-Gehalt. Im Abstand von zwei Tagen wurden die Zellen verdünnt, wozu die sie zunächst mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und dann durch Zugabe von Trypsinlösung (0,5 mM EDTA und 2‰ Trypsin, Merck, in PBS) von der Unterlage abgelöst wurden. Etwa ¹/₅ der Zellsuspension wurde mit frischem Medium aufgefüllt und weiter kultiviert. Zum Einfrieren wurden die Zellen abgelöst,

sedimentiert (300 x g, 5 min), in Einfriermedium (Zellkulturmedium supplementiert mit 50% fetalem Kälberserum und 10% DMSO) resuspendiert und in Styropor verpackt bei -80°C langsam eingefroren. Nach einem Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff übergeführt.

ES-Zellen wurden mittels Elektroporation transfiziert: zu 10^7 Zellen in 800 µl PBS wurde 40 µg linearisierter „targeting“-Vektor gegeben und in einer 4 mm Küvette bei 240 V und 500 µF (Genepulser, Biorad) transfiziert. Die Zellen wurden auf vier Zellkulturschalen (Ø 10 cm) verteilt, die wachstumsinaktivierte embryonale Fibroblasten enthielten. Dem Zellkulturmedium wurde nach zwei Tagen zunächst 400 µg/ml G418 (Gibco) und ab dem fünften Tag zusätzlich 2 µM Gancyclovir (Syntex) zugesetzt. Nach sieben bis acht Tagen konnten Zellklone mit einer Pipette in 25 µl PBS abgelöst und auf 96-Loch Platten in 25 µl Trypsinlösung dissoziiert werden. Die Dissoziation wurde nach zehn Minuten durch Zugabe von 200 µl Zellkulturmedium gestoppt und die Zellen anschließend für vier Tage kultiviert. Dann wurden $\frac{2}{3}$ der Zellen wie oben beschrieben eingefroren und der Rest auf mit 0,5% Gelatine in PBS vorbehandelten 96-Loch Platten bis zur vollständigen Konfluenz weiterkultiviert. Aus diesen Zellen wurde genomische DNA nach der Methode von Ramirez-Solis et al. (1992) isoliert.

4.4 Proteinextraktion aus Mausgewebe, Proteingelelektrophorese und Immunoblot („Western-Blot“)

Das Gewebe wurde in L-CAM-Puffer (140 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 0,7 mM MgSO₄, 1,2 mM CaCl₂, 10 mM Hepes pH 7,4, 1% TritonX100, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid) zerkleinert. Die Suspension wurde unter Schütteln für 20 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (12000 x g, 4 °C, 10 min) wurden nicht lösliche Zellbestandteile sedimentiert.

Zur Trennung von Proteingemischen wurden denaturierende Polyacrylamidgele (Abmessungen: 12 x 14,5 x 0,12 cm³) mit 10% Acrylamid verwendet. Das Volumenverhältnis von Sammelgel (4,87% Acrylamid, 1,3‰ N,N'-Methylenbisacrylamid, 62,5 mM Tris-HCl pH6,8, 2‰ SDS, 1‰ APS, 0,5‰ TEMED) zu Trenngel (10%

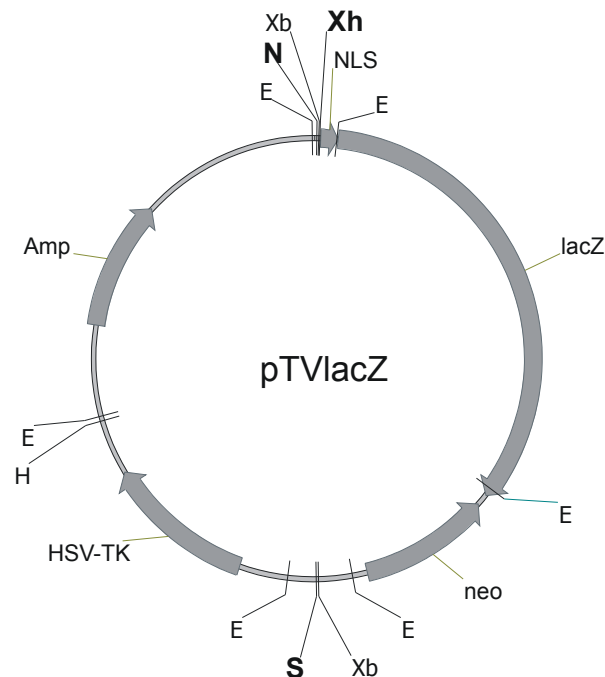
Acrylamid, 2,5‰ N,N'-Methylenbisacrylamid, 150mM Tris-HCl pH8,8, 2‰ SDS, 1‰ APS, 0,5‰ TEMED) betrug 1:2. Die Proben wurden mit $\frac{1}{4}$ Vol. 4x Dissoziationspuffer (300 mM Tris-HCl pH 6,8, 6% SDS, 12 mM EDTA, 6% β -Mercaptoethanol, 30% Glycerin, 0,3‰ Bromphenolblau) versetzt, 5 min bei 95°C inkubiert, danach auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit 40 mA für ca. 3 h; als Laufpuffer wurde Laemmli-Puffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,2% SDS) verwendet. Als Proteingrößenstandard wurde das Proteingemisch SDS-6H (Proteingrößen: 205 kDa, 116 kDa, 97,4 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 29 kDa) von Sigma eingesetzt.

Für den Immunoblot wurden die Proteine elektrophoretisch von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Millipore HAWP 10) in Blotpuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris-HCl pH 8,6) transferiert. Die Nitrozellulosemembran wurde in Blockierungspuffer (5% Magermilchpulver, Minoform Nestlé, in PBS) präadsorbiert. Anschließend wurde die Membran mit der Erstantikörperlösung (C/G7, monoklonal Maus gegen Conductin (Lustig, Jerchow et al., 2002)) inkubiert. Nach Waschen in Blockierungspuffer wurde die Membran in einer Lösung von Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper (1:1000 Verdünnung von Anti-Maus-Antikörper aus der Ziege, Dianova, in Blockierungspuffer) inkubiert, zweimal in Blockierungslösung und viermal in PBS gewaschen und der Antigen/Antikörper/Antikörper-Peroxidase-Komplex mittels Chemoluminiszenzreaktion ("ECL-detection-kit", Amersham) nachgewiesen.

4.5 Konstruktion des „targeting“-Vektors

Als Ausgangsvektor für die Konstruktion des „targeting“-Vektors wurde eine weiterentwickelte Form des Vektors pTV0 (Riethmacher et al., 1995) eingesetzt. Er enthält mit einem Neomycinresistenzgen (neo) und der *Herpes simplex* Virus-Thymidinkinase (HSV-TK) zwei Gene zur Positiv/Negativselektion, jeweils unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase-Promotors. In diesen Vektor wurde von J. Hülsken die cDNA der bakteriellen β -Galaktosidase (lacZ) zusammen mit einem Kaninchen- β -Globin-Intron und einem SV40-Polyadenylierungssignal aus dem Vektor 497-524.Z (Picard and Yamamoto, 1987) isoliert. Dabei wurde gleichzeitig durch PCR-Mutagenese eine XhoI-Restriktionsschnittstelle anstelle des Startkodons

eingeführt (Huelsenken et al., 2000). Die folgende Übersicht zeigt ein Schema dieses Vektors mit relevanten Restriktionsschnittstellen.

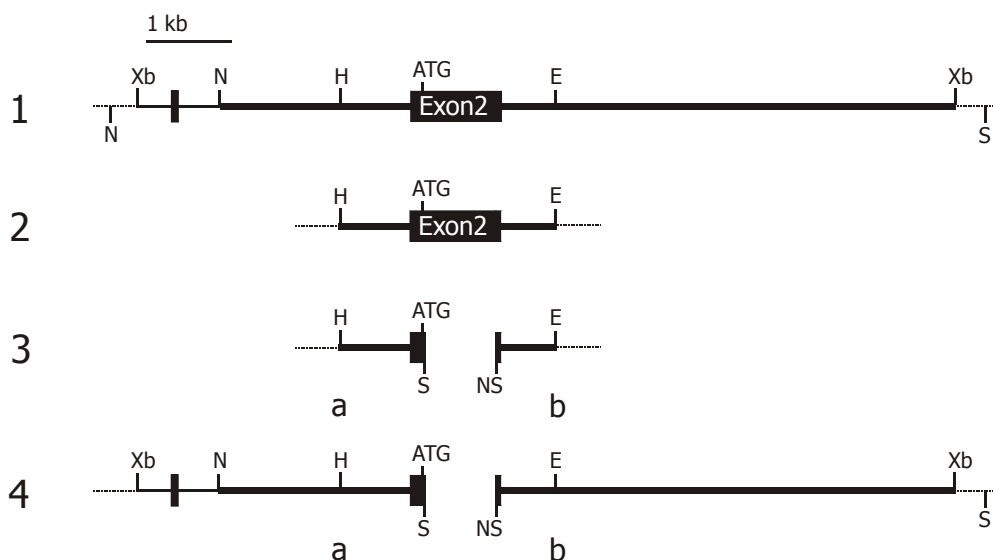


ES-Zellklone, welche die DNA des „targeting“-Vektors in ihr Genom aufgenommen haben, wurden positiv auf die Neomycinresistenz selektioniert. Klone, bei denen diese Integration durch homologe Rekombination stattgefunden hat, verlieren die HSV-TK-Kassette. Dagegen verbleibt bei zufälliger Integration diese Kassette im Genom. In diesem Fall können die betreffenden Zellen durch Zusatz des Nukleosid-analogs Gancyclovir, welches nach Phosphorylierung durch die HSV-TK in die DNA eingebaut wird und zum Absterben der Zellen führt, negativ selektioniert werden.

Um die Ausbeute der homologen Rekombination zu erhöhen, wurde eine isogene genomische DNA-Bank aus dem Mausstamm 129 (die verwendeten ES-Zellen stammen aus demselben Mausstamm) verwendet. Zum Durchmustern der Bank wurde ein PCR-Protokoll etabliert, welches einen 285bp großen, im zweiten Exon von *Conductin* gelegenen Bereich amplifiziert. Hierzu wurden die folgenden „Primer“ und Bedingungen verwendet:

AGCGCCGTGTTAGTGACTCTCCTT, AGTCCGGAAGAGGTATGCACCATC; 2,5 U/100 µl Taq-Polymerase, 10 pmol von beiden „Primern“, 1 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,001% Gelatine; 96°C 6s, 67°C 20s, 72°C 45 s, 35 Zyklen.

Das Durchmustern einer P1-Phagen-Bank wurde bei der Firma Genome Systems, St. Louis, USA in Auftrag gegeben. Drei von der Firma isolierte Phagen wurden nach den Vorgaben von Genome Systems amplifiziert und die DNA isoliert. Nach weiterer Analyse der isolierten DNA mittels Southern Blot wurden zwei überlappende genomische Fragmente von 5 und 9 kb in pBluescript II SK⁺ subkloniert. Wie durch Southern Blot und Sequenzierung gezeigt werden konnte, beinhalten die Fragmente die Exone 1 und 2 des murinen *Conductin*-Gens sowie umgebende intronische Sequenzen (vergl. hierzu auch Abb. 2.1). Das folgende Schema zeigt die Struktur des *Conductin*-Gens für den Bereich des ersten und zweiten (enthält das Startkodon) Exons, die für die Konstruktion des „targeting“-Vektors benutzten Teilfragmente aus diesem Bereich sowie verwendete Restriktionsschnittstellen. Sequenzen aus pBluescript II SK⁺ sind gestrichelt dargestellt.



Aus dem Fragment 1 wurde zunächst das Fragment 2 über die HindIII (H)- und EcoRI (E)-Restriktionsschnittstellen subkloniert. Zur Konstruktion des 5′-„Arms“ des Vektors wurde über PCR-Mutagenese nach dem ATG-Startkodon eine SalI (S)-Restriktionsstelle eingeführt, 3a (5′ „Primer“ in pBluescript II SK⁺ gelegen, 3′ „Primer“ GGC GGG **TCG ACA** CTC ATG GTG AGG GAG AGC, Fettdruck: S-Stelle, Unterstreichung: Startkodon in 3′-5′-Richtung). Zur Konstruktion des 3′-„Arms“

wurden am Ende von Exon 2 eine NotI (N)- und eine S-Schnittstelle eingeführt, 3b (5' „Primer“ GAT AGC **GGC CGC GTC GAC** AGT GTG AGA TCC ACG GAA A; Fettdruck: N- und S-Stelle, 3' „Primer“ in pBluescript II SK⁺ gelegen). Die Fragmente 3a und 3b wurden daraufhin über H/S bzw. N/E in das Ausgangskonstrukt 1 kloniert, woraus die beiden fertigen „Arme“ 4a und 4b entstanden. Der Vektor pTVlacZ (s. oben) wurde an der N- und der XhoI (Xh)-Schnittstelle geöffnet und das aus 4a über N und S isolierte Fragment inseriert (S ist kompatibel zu Xh, beide Schnittstellen gehen bei der Ligation verloren). Der Vektor wurde zuletzt über S geöffnet und das aus 4b über S isolierte Fragment inseriert. Die folgende Abbildung zeigt schematisch das resultierende „targeting“-Konstrukt.



4.6 Etablierung neuer Mausstämme durch Blastozysteninjektion

Zur Entnahme von Blastozysten wurden schwangere Weibchen der Mauslinie C57Bl6 am dritten Tag (E3,5) nach der Kopulation (der Morgen nach der Kopulation wird als E0,5 gewertet) getötet und deren Uteri entnommen. Mittels einer feinen Kanüle (Außen-Ø 0,21 mm, Hamilton) wurden die Embryonen mit ca. 500 µl Blastozystenmedium (Zellkulturmedium für ES-Zellen mit 30 mM Hepes pH 7,2) vom Infundibulum aus durch den Uterus herausgespült, mit einer Mundkapillare aufgenommen und bis zur Injektion in Blastozystenmedium bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank kultiviert.

Zur Injektion der ES-Zellklone in Blastozysten wurde die anderswo beschriebene Injektionsapparatur verwendet (Huelsken, 1998). Zur Injektion wurden ES-Zellen eines Klons durch Trypsinbehandlung vereinzelt und in Blastozystenmedium aufgenommen (10⁴ bis 10⁵ Zellen/ml). In die Injektionskammer wurden 100 µl dieser Zellsuspension und 10 bis 20 Blastozysten gegeben und mit Silikonöl (Serva) überschichtet. Mit der Injektionsnadel wurden dann jeweils 5 bis 20 ES-Zellen aufgenommen und mit der Haltenadel eine Blastozyste so fixiert, dass die Injektionsnadel in das Blastocoel vordringen konnte, ohne die innere Zellmasse zu

verletzen. Nach der Injektion der ES-Zellen in das Blastocoel wurden die Blastozysten mit einer Mundkapillare aufgenommen und wie oben beschrieben kultiviert.

Die Blastozysten wurden am Abend des gleichen Tages in scheinschwangere CB6F1 Weibchen (mind. 12 Wochen alt und 25 g schwer) transferiert, die hierzu mit sterilen Männchen verpaart worden waren. Da die Entwicklung der Blastozysten durch die Injektion verzögert wird, wurden für den Transfer Weibchen an E2,5 verwendet. Nach Betäubung der Tiere mit Ketamin/Xylazin wurden mit einer Mundkapillare nacheinander in beide Hörner des Uterus jeweils sechs bis acht Blastozysten transferiert. Das Bauchfell wurde anschließend vernäht und die Öffnung im Fell durch Klammern verschlossen (Autoclip 9 mm, Becton Dickinson).

Chimäre Männchen, die aus den injizierten Blastozysten hervorgegangen waren, wurden mit weiblichen C57Bl/6J Mäusen ab dem Alter von acht Wochen verpaart. Von F1-Nachkommen mit braunem Fell wurde zur Genotypisierung vier Wochen nach der Geburt ca. 5 mm der Schwanzspitze unter Betäubung abgesetzt und in Lysepuffer (200 mM NaCl, 100 mM Tris pH 8,5, 5 mM EDTA, 0,2% (w/v) SDS, 200 µg/ml Proteinase K) ü.N. bei 55°C unter Schütteln aufgeschlossen. Hieraus konnte entweder durch Phenolextraktion und Fällung DNA für die Genotypisierung durch „Southern-Blot“ gewonnen werden oder nach zwanzigfacher Verdünnung mit Wasser direkt mittels PCR genotypisiert werden.

4.7 Genotypisierungen

Zur Genotypisierung des *Conductin*-Lokus mittels „Southern-Blot“ wurde ein ca. 800 bp großes XbaI/NotI-Fragment verwendet, das sich genomisch 5' von der im 5'-„Arm“ des „targeting“-Vektors benutzten Sequenz befindet. Die genomische DNA aus der Maus wurde für den „Southern-Blot“ mit der Restriktionsendonuklease EcoRI gespalten. Zur Genotypisierung mittels PCR wurden folgende „Primer“ und Bedingungen verwendet:

Cs AAGCTGCGTCGGATACTTGAGA, Cwt AGTCCATCTTCATTCCGCCTAGC, lacZ TGGTAATGCTGCAGTGGCTTG; 12 pmol Cs, jeweils 6 pmol Cwt und lacZ, 200 µM dNTPs, 1,7 mM MgCl₂, 0,025% Detergenz W-1 (Invitrogen), 0,08% DMSO und 0,07 U Taq-

Polymerase (Invitrogen) in 15 µl Gesamtvolumen mit 1x PCR-Puffer (Invitrogen) und 40 Zyklen jeweils 6 s 96°C, 15 s 60°C und 90 s 72°C.

Zur Genotypisierung des *Axin*-Lokus wurden folgende „Primer“ und Bedingungen verwendet:

wt1 GGGGTGGCTGTTGAGGTC, wt2 CGGAGCAAGTTTCACCGAAG, tg1 CGAGGTCAGTCACACAATAG, tg2 TACGTGTACAGGATGTGCAG; jeweils 24 pmol wt1 und wt2, jeweils 6 pmol tg1 und tg2, 200 µM dNTPs, 1,33 mM MgCl₂, 0,127% Detergenz W-1 (Invitrogen), 0,04% DMSO und 0,07 U Taq-Polymerase (Invitrogen) in 15 µl Gesamtvolumen mit 1x PCR-Puffer (Invitrogen) und 40 Zyklen jeweils 6 s 96°C, 15 s 60°C und 60 s 72°C.

4.8 Embryoschnitte und -färbungen

Zur Einbettung in Paraffin wurden die Embryonen aus dem Uterus präpariert und Dottersack und Amnion entfernt. Anschließend wurden die Embryonen ü.N. bei 4°C in 4% Formaldehyd in PBS fixiert. Die Embryonen wurden mittels einer Alkoholreihe dehydriert (1 h 70% Ethanol, 30 min 80% Ethanol, 30 min 90% Ethanol, 1 h 96% Ethanol, 30 min 96% Ethanol, 1 h Ethanol, 30 min Ethanol), in Toluol überführt (zweimal 15 min) und ü.N. bei 60°C in Paraffin inkubiert. Am nächsten Tag konnten die Embryonen in Paraffinblöckchen eingegossen und nach Abkühlung bei 4°C auf einem Mikrotom (Microm, Heidelberg) in 7 bis 10 µm dünne Schnitte geschnitten werden. Diese wurden 30 min bei 60°C auf positiv geladenen Glasobjektträgern (SuperFrost Plus, Menzel) fixiert.

Um Paraffinschnitte weiter zu verwenden, wurden diese zunächst entwacht (dreimal 5 min Xylol) und mittels einer Alkoholreihe rehydriert (zweimal 5 min Ethanol, 2 min 95% Ethanol, 2 min 85% Ethanol, 2 min 70% Ethanol, 2 min 50% Ethanol, 2 min 30% Ethanol, 5 min PBS). Kerne wurden entweder mit Mayers Hämatoxylin (1 g/l Hämatoxylin, 200 mg/l NaJO₃, 50 g/l Kalialaun = Al₂(SO₄)₃ x K₂(SO₄) x 24H₂O, 50 g/l Trichloracetaldehydhydrat, 1 g/l Na-Citrat) oder mit 0,1% PyroninG und Zellen und Extrazellulärmatrix mit 0,1% EosinY gefärbt.

Zur Detektion der lacZ-Expression wurden die Embryonen für 5 min in 0,2% Glutaraldehyd in KP-Puffer (2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4) fixiert, mit 0,01% Natriumdesoxycholat und 0,02% Nonident P-40 in

KP-Puffer permeabilisiert und mit 0,5 mg/ml X-Gal, 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ und 10 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ in KP-Puffer bei 37°C gefärbt.

4.9 Immunohistochemie

Für immunohistochemische Untersuchungen an Paraffinschnitten wurden diese wie oben beschrieben entwacht und rehydriert. Um die Antigene zu exponieren, wurden die Schnitte anschließend dreimal 5 min in der Mikrowelle in 10 mM Natriumcitrat pH 6,0 erhitzt. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen in Inkubationslösung (10% Ziegsenrum und 0,1% Tween20 in PBS) abgesättigt (30 min bis 4 h), die Objekte mit der Verdünnung des ersten Antikörpers (anti-Phospho-Histon H3, Kaninchenserum, Upstate Biotechnology, 1:200 in Inkubationslösung) bedeckt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit PBS (viermal 10 min) wurden die Objekte mit der Verdünnung des zweiten Antikörpers (Ziege anti Kaninchen-IgG, alkalische Phosphatase-gekoppelt, Dianova, 1:50 in Inkubationslösung) bedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen (wie oben). Danach wurde zweimal 10 min in NTMT (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM $MgCl_2$, 0,1% Tween20) gewaschen und mit NBT/BCIP (5 μ l NBT, 100 mg/ml in DMF, Roche, und 3,75 μ l BCIP, 50 mg/ml in DMF, Roche, auf 1 ml NTMT) im Dunkeln bei Raumtemperatur gefärbt.

4.10 In situ Hybridisierung

Der Nachweis der Expression von Genen auf Transkriptionsebene wurde durch *in situ* Hybridisierungen mit Digoxigenin (DIG)-markierten RNA-Proben an Paraffinschnitten und ganzen Embryonen („whole mount“) durchgeführt. Die Synthese und Markierung der RNA-Proben erfolgte in einer *in vitro* Einzelstrang-RNA-Synthese nach Angaben des Herstellers (Roche), nicht eingebaute Nukleotide wurden mittels Säulenchromatographie (RNeasy, QUIAGEN) abgetrennt. Die folgende Tabelle informiert über die verwendeten Sonden, deren Herkunft, mit welcher Restriktionsendonuklease die betreffenden Plasmide linearisiert wurden und welche

RNA-Polymerase jeweils zur RNA-Synthesen in „antisense“-Richtung eingesetzt wurde:

Sonde	Genbank Accession #	Herkunft	Resrikt.- enzym	RNA- Pol.
Crabp1	NM 013496	bp 69-711 in pGEM 5Zf ⁺	Sall	T7
Cer-I	AF 031896	erhalten von J. Hülsken		
En1	NM 010133	bp 685-1836 in pBSKS	Clal	T7
Fgf8	NM 010205	bp 80-900 in pBS	BamHI	T7
Hesx1	XM 122684	bp 30-424 in pBS	BamHI	T3
Krox20 (Egr2)	XM 125648	erhalten von D. Zechner		
Otx2	NM 144841	erhalten von J. Hülsken	EcoRI	SP6
Rax	NM 013833	erhalten von C. L. Cepko (Furukawa et al., 1997)	HindIII	T3
Shh	X 76290	bp 120-760 in pBS	HindIII	T3

Zur Kontrolle wurden Transkripte in „sense“-Richtung verwendet. Alle Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser (Sambrook et al., 1989) angesetzt, Geräte mit diesem Wasser gewaschen und zusätzlich 1 h autoklaviert.

Die Paraffinschnitte wurden wie oben beschrieben entwacht und rehydriert, für 15 min in 4% Formaldehyd (in PBS) fixiert und in 6% H₂O₂ (in PBS) für 1 h gebleicht.

Nach einer Proteasebehandlung (10 min 10 µg/ml Proteinase K in PBS, um die RNA zugänglich zu machen) und erneuter Fixierung (10 min in 4% Formaldehyd in PBS) wurden die Schnitte acetyliert (10 min 0,25% Essigsäureanhydrid in 100 mM Tris-HCl pH 7,5), um eine unspezifische Bindung der RNA-Sonden zu minimieren. Anschließend wurde in 2x SSC (Sambrook et al., 1989) umgepuffert und die Schnitte über die umgekehrte Alkoholreihe dehydriert und getrocknet. Von der Hybridisierungslösung (5x SSC, 50% Formamid, 5% „blocking reagent“, Roche, 10 % Dextransulfat, 5 mM EDTA, 0,1% Tween 20, 100 µg/ml Heparin, 100 µg/ml denaturierte tRNA, 100 µg/ml denaturierte Heringssperma DNA und 1 µg/ml denaturierte DIG-markierte RNA-Sonde) wurde 40 µl auf die Schnitte gegeben, mit einem silikonisierten (Sigmacote, Sigma) Deckgläschen abgedeckt und über Kopf in einer feuchten Kammer ü.N. bei 63°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst 10 min in 5x SSC mit 50% Formamid und dann zweimal 10 min in 2x SSC mit 50% Formamid bei 60°C gewaschen. Anschließend wurde in TES (0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) umgepuffert und überschüssige, einzelsträngige RNA für 30 min mit 20 µg/ml RNaseA in TES bei 37°C abgebaut. Erneut wurde zweimal 15 min in 1x SSC und anschließend 30 min in 0,2x SSC bei 60°C gewaschen. Die Schnitte wurden in TBS (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM KCl) umgepuffert und mit Blockierungslösung (1% „blocking reagent“, Roche, 10% Schafserum, 0,1% TritonX100 in TBS) für zwei Stunden bei 4 °C behandelt. Der Anti-DIG-Antikörper (Fab-Fragment aus dem Schaf, Roche) wurde in einer 1:1000 Verdünnung in Blockierungslösung zunächst mit Embryopuder (Acetonextrakt aus in Flüssigstickstoff pulverisierten Mausembryonen E14,5 bis E16,5) präadsorbiert (zwei Stunden bei 4 °C, Überstand weiter verwendet) und dann auf den Schnitten ü.N. bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde überschüssiger Antikörper durch sechsmaliges Waschen mit TBS mit 0,1 % TritonX100 entfernt, endogene Phosphataseaktivität durch 1 mM Levamisol in NTMT (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM MgCl₂, 0,1 % Tween20) inhibiert, und die Schnitte in „BM purple AP-substrate“ (Roche) im Dunkeln bei 4°C bis 37°C für ein bis fünf Tage gefärbt.

Zum Nachweis der Transkripte an ganzen Embryonen wurden diese zunächst freipräpariert und in 4% Formaldehyd in PBS bei 4°C fixiert (je nach Größe 2 h bis 12 h). Alle weiteren Schritte wurden, wenn nicht anders angegeben, auf Eis durchgeführt. Sollten die Embryonen bei -20°C gelagert werden, wurden sie mittels einer Alkoholreihe dehydriert (15 min 25% Methanol in PBS, 30 min 50% Methanol in PBS, 1 h 75% Methanol in Wasser, 100% Methanol). Vor der Verwendung wurden die Embryonen zunächst rehydriert (15 min 75% Methanol in Wasser, 15 min 50% Methanol in PBS, 15 min 25% Methanol in PBS, PBS). Bei Embryonen älter als E9 wurden die Vesikel im Kopfbereich (Gehirn, optische und otische Vesikel) und das Herz mit einer Nadel punktiert, um einen besseren Durchfluss der Reagenzien zu erreichen. Die Embryonen wurden nun 15 min bei Raumtemperatur gebleicht (6% H₂O₂ in PBS), gefolgt von dreimaligem Waschen in PBSw (PBS mit 0,1% Tween20). Danach wurden die Embryonen in einer Proteinase K-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert (E6 3 min, E7,5 5 min, E8,5 7 min, E9,5 9 min, E10,5 11 min 4,5 µg/ml Proteinase K in PBSw). Die Proteinase wurde durch Inkubation der Embryonen in 2 mg/ml Glycin in PBSw inaktiviert, anschließend wurde dreimal mit PBSw gewaschen. Es wurde 15 min fixiert (4% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd in PBSw) und wieder dreimal in PBSw gewaschen. Die Embryonen wurden jeweils bis zum Absinken in 50% Hybridisierungslösung (1% „blocking reagent“, Roche, 50% Formamid, 5x SSC, 1 mg/ml denaturierte tRNA, 0,1 mg/ml Heparin, 5 mM EDTA) in PBSw und reiner Hybridisierungslösung inkubiert. Anschließend wurde für 2 h bis 3 h bei 65°C in Hybridisierungslösung prähybridisiert. Schließlich wurden die Embryonen ü.N. mit der entsprechenden Sonde (0,2 bis 1 µg/ml in Hybridisierungslösung) bei 65°C bis 70°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 min mit Hybridisierungslösung bei 70°C gewaschen und dreimal jeweils ½ Vol. der Hybridisierungslösung 2x SSC pH 4.5 zugegeben und 5 min bei 70°C gewaschen. Danach wurde 30 min in 2x SSC pH 7 bei 70°C gewaschen, in TES (0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) umgepuffert und überschüssige einzelsträngige RNA für 30 min mit 20 bis 50 µg/ml RNaseA in TES bei Raumtemperatur oder 37°C abgebaut. Dann wurde in 2x SSC pH 7 umgepuffert und erneut 30 min in 2x SSC pH7 bei 70°C gewaschen. Es folgten zwei zehnminütige Waschschrte in MAB (150 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH

7,5) bei 70°C, zwei zehnminütige Waschschrte in PBS und ein fünfminütiger in PBSw, jeweils bei Raumtemperatur. Der Anti-DIG-Antikörper (Fab-Fragment aus dem Schaf, Roche) wurde in einer 1:2000 Verdünnung in Blockierungslösung (1% „blocking reagent“, Roche, 10% Schafserum in PBSw) mit Embryopuder (Acetonextrakt aus in Flüssigstickstoff pulverisierten Mausembryonen E14,5 bis E16,5) präadsorbiert (zwei Stunden bei 4°C, Überstand weiter verwendet). Die Embryonen wurden mit Blockierungslösung für zwei Stunden bei 4 °C behandelt und dann mit der Antikörperlösung ü.N. bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde überschüssiger Antikörper durch mindestens sechs Waschungen mit 0.1% BSA in PBSw (jeweils 40 min) und zwei Waschungen mit PBSw (jeweils 30 min) entfernt. Danach wurde zweimal 10 min in NTMT (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM MgCl₂, 0,1 % Tween20) gewaschen und die Embryonen in „BM purple AP-substrate“ (Roche) im Dunkeln bei 4°C oder Raumtemperatur 30 min bis 2 Tage gefärbt.

4.11 TUNEL-Reaktion zum Apoptosenachweis

Der Nachweis der Apoptose beruht auf dem Einbau Fluoreszenz-markierter Nukleotide mit Hilfe der Terminalen Desoxynukleotidtransferase an das 3´-OH Ende von mono- und oligonukleosomaler DNA (TUNEL = TdT-mediated dUTP nick end labelling). Die Nachweisreaktion wurde an Paraffinschnitten durchgeführt, die zunächst wie oben beschrieben entwacht und rehydriert und danach für 15 min bei 37°C in 20 µg/ml Proteinase K in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 inkubiert wurden. Die Schnitte wurden für 30 min mit 0,3% H₂O₂ (in Methanol) behandelt und durch Inkubation für 2 min auf Eis mit 0,1% TritonX100 (in 12 mM Natriumcitrat) permeabilisiert. Die TUNEL-Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers (Roche) durchgeführt, die Schnitte mit Moviol eingebettet und am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4.12 Material und Geräte

Soweit nicht gesondert angegeben wurden Chemikalien von Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen),

radioaktive Nukleotide von Amersham-Buchler (Braunschweig), Enzyme von Roche und New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) und Oligonukleotide von BioTeZ (Berlin) bezogen. Es wurden folgende Zentrifugen benutzt: Minifuge RF, Heraeus Sepatech, Varifuge 3.0 R, Heraeus Sepatech, Centrifuge 5402, Eppendorf und Centrifuge J2-21, Beckman, mit Rotoren JA 10 und JA 20.

5 Literaturverzeichnis

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 16, 3797-3804.
- Ahmed, Y., Hayashi, S., Levine, A., and Wieschaus, E. (1998). Regulation of armadillo by a Drosophila APC inhibits neuronal apoptosis during retinal development. *Cell* 93, 1171-1182.
- Akimaru, H., Chen, Y., Dai, P., Hou, D.X., Nonaka, M., Smolik, S.M., Armstrong, S., Goodman, R.H., and Ishii, S. (1997). Drosophila CBP is a co-activator of cubitus interruptus in hedgehog signalling. *Nature* 386, 735-738.
- Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M., and Hooper, J.E. (1996). The Drosophila smoothed gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell* 86, 221-232.
- Altaba, A. (1998). Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. *Development* 125, 2203-2212.
- Altaba, A. (1999). Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* 126, 3205-3216.
- Amanai, K. and Jiang, J. (2001). Distinct roles of Central missing and Dispatched in sending the Hedgehog signal. *Development* 128, 5119-5127.
- Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J.S., Ben Shushan, E., Mann, M., Ben Neriah, Y., and Alkalay, I. (2002). Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* 16, 1066-1076.
- Andreazzoli, M., Gestri, G., Angeloni, D., Menna, E., and Barsacchi, G. (1999). Role of Xrx1 in Xenopus eye and anterior brain development. *Development* 126, 2451-2460.
- Aruga, J., Nagai, T., Tokuyama, T., Hayashizaki, Y., Okazaki, Y., Chapman, V.M., and Mikoshiba, K. (1996a). The mouse Zic gene family - Homologues of the Drosophila pair-rule gene odd-paired. *Journal of Biological Chemistry* 271, 1043-1047.
- Aruga, J., Yozu, A., Hayashizaki, Y., Okazaki, Y., Chapman, V.M., and Mikoshiba, K. (1996b). Identification and characterization of Zic4, a new member of the mouse Zic gene family. *Gene* 172, 291-294.
- Asbrand, C. Neue Mechanismen der Regulation von Conductin im Wnt/beta-Catenin-Signalweg. (2002). Ref Type: Thesis/Dissertation
- Ascano, M., Jr., Nybakken, K.E., Sosinski, J., Stegman, M.A., and Robbins, D.J. (2002). The carboxyl-terminal domain of the protein kinase fused can function as a dominant inhibitor of hedgehog signaling. *Mol. Cell Biol.* 22, 1555-1566.
- Aza-Blanc, P., Lin, H.Y., Altaba, A., and Kornberg, T.B. (2000). Expression of the vertebrate Gli proteins

- in *Drosophila* reveals a distribution of activator and repressor activities. *Development* 127, 4293-4301.
- Bafico,A., Liu,G., Yaniv,A., Gazit,A., and Aaronson,S.A. (2001). Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.* 3, 683-686.
- Barolo,S. and Posakony,J.W. (2002). Three habits of highly effective signaling pathways: principles of transcriptional control by developmental cell signaling. *Genes Dev.* 16, 1167-1181.
- Behrens,J. (1999). Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev.* 18, 15-30.
- Behrens,J. (2000). Control of beta-catenin signaling in tumor development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 910, 21-33.
- Behrens,J., Jerchow,B.A., Wurtele,M., Grimm,J., Asbrand,C., Wirtz,R., Kuhl,M., Wedlich,D., and Birchmeier,W. (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3 beta. *Science* 280, 596-599.
- Behrens,J., vonKries,J.P., Kuhl,M., Bruhn,L., Wedlich,D., Grosschedl,R., and Birchmeier,W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-642.
- Belenkaya,T.Y., Han,C., Standley,H.J., Lin,X., Houston,D.W., Heasman,J., and Lin,X. (2002). *pygopus* Encodes a nuclear protein essential for wingless/Wnt signaling. *Development* 129, 4089-4101.
- Bellaiche,Y., The,I., and Perrimon,N. (1998). Tout-velu is a *Drosophila* homologue of the putative tumour suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature* 394, 85-88.
- Belloni,E., Muenke,M., Roessler,E., Traverso,G., Siegel-Bartelt,J., Frumkin,A., Mitchell,H.F., Donis-Keller,H., Helms,C., Hing,A.V., Heng,H.H., Koop,B., Martindale,D., Rommens,J.M., Tsui,L.C., and Scherer,S.W. (1996). Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat. Genet.* 14, 353-356.
- Benedyk,M.J., Mullen,J.R., and Dinardo,S. (1994). Odd-Paired - A Zinc-Finger Pair Rule Protein Required for the Timely Activation of Engrailed and Wingless in *Drosophila* Embryos. *Genes & Development* 8, 105-117.
- Bhanot,P., Brink,M., Samos,C.H., Hsieh,J.C., Wang,Y., Macke,J.P., Andrew,D., Nathans,J., and Nusse,R. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382, 225-230.
- Bishop,K.M., Goudreau,G., and O'Leary,D.D. (2000). Regulation of area identity in the mammalian neocortex by *Emx2* and *Pax6*. *Science* 288, 344-349.
- Brannon,M., Brown,J.D., Bates,R., Kimelman,D., and Moon,R.T. (1999). XCTBP is a XTCF-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* 126, 3159-3170.
- Brewster,R., Lee,J., and Altaba,A.R.I. (1998). Gli/Zic factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation. *Nature* 393, 579-583.

- Brown,L.Y., Odent,S., David,V., Blayau,M., Dubourg,C., Apacik,C., Delgado,M.A., Hall,B.D., Reynolds,J.F., Sommer,A., Wieczorek,D., Brown,S.A., and Muenke,M. (2001). Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2: alanine tract expansion mutations may be caused by parental somatic recombination. *Hum. Mol. Genet.* 10, 791-796.
- Brown,S.A., Warburton,D., Brown,L.Y., Yu,C.Y., Roeder,E.R., Stengel-Rutkowski,S., Hennekam,R.C., and Muenke,M. (1998). Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of *Drosophila* odd-paired. *Nat. Genet.* 20, 180-183.
- Buendia,M.A. (2000). Genetics of hepatocellular carcinoma. *Semin. Cancer Biol.* 10, 185-200.
- Bumcrot,D.A., Takada,R., and McMahon,A.P. (1995). Proteolytic processing yields two secreted forms of sonic hedgehog. *Mol. Cell Biol.* 15, 2294-2303.
- Cavallo,R.A., Cox,R.T., Moline,M.M., Roose,J., Polevoy,G.A., Clevers,H., Peifer,M., and Bejsovec,A. (1998). *Drosophila* TCF and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395, 604-608.
- Chamoun,Z., Mann,R.K., Nellen,D., von Kessler,D.P., Bellotto,M., Beachy,P.A., and Basler,K. (2001). Skinny hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the hedgehog signal. *Science* 293, 2080-2084.
- Chen,C.H., von Kessler,D.P., Park,W., Wang,B., Ma,Y., and Beachy,P.A. (1999a). Nuclear trafficking of Cubitus interruptus in the transcriptional regulation of Hedgehog target gene expression. *Cell* 98, 305-316.
- Chen,C.P., Chern,S.R., Du,S.H., and Wang,W. (2002). Molecular diagnosis of a novel heterozygous 268C-->T (R90C) mutation in TGIF gene in a fetus with holoprosencephaly and premaxillary agenesis. *Prenat. Diagn.* 22, 5-7.
- Chen,G., Fernandez,J., Mische,S., and Courey,A.J. (1999b). A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev.* 13, 2218-2230.
- Chen,Y. and Struhl,G. (1996). Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 87, 553-563.
- Chen,Y. and Struhl,G. (1998). In vivo evidence that Patched and Smoothed constitute distinct binding and transducing components of a Hedgehog receptor complex. *Development* 125, 4943-4948.
- Cheng,S.Y. and Bishop,J.M. (2002). Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 5442-5447.
- Cheyette,B.N., Waxman,J.S., Miller,J.R., Takemaru,K., Sheldahl,L.C., Khlebtsova,N., Fox,E.P., Earnest,T., and Moon,R.T. (2002). Dapper, a Dishevelled-associated antagonist of beta-

- catenin and JNK signaling, is required for notochord formation. *Dev. Cell* 2, 449-461.
- Chow,R.L., Altmann,C.R., Lang,R.A., and Hemmati-Brivanlou,A. (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* 126, 4213-4222.
- Christensen,E.I. and Birn,H. (2002). Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 256-266.
- Chuang,P.T. and McMahon,A.P. (1999). Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* 397, 617-621.
- Cimbora,D.M. and Sakonju,S. (1995). Drosophila Midgut Morphogenesis Requires the Function of the Segmentation Gene Odd-Paired. *Developmental Biology* 169, 580-595.
- Cohen,M.M., Jr. and Shiota,K. (2002). Teratogenesis of holoprosencephaly. *Am. J. Med. Genet.* 109, 1-15.
- Croen,L.A., Shaw,G.M., and Lammer,E.J. (1996). Holoprosencephaly: epidemiologic and clinical characteristics of a California population. *Am. J. Med. Genet.* 64, 465-472.
- Dahmen,R.P., Koch,A., Denkhaus,D., Tonn,J.C., Sorensen,N., Berthold,F., Behrens,J., Birchmeier,W., Wiestler,O.D., and Pietsch,T. (2001). Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. *Cancer Res.* 61, 7039-7043.
- Dai,P., Akimaru,H., Tanaka,Y., Maekawa,T., Nakafuku,M., and Ishii,S. (1999). Sonic Hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.* 274, 8143-8152.
- Dattani,M.T., Martinez-Barbera,J.P., Thomas,P.Q., Brickman,J.M., Gupta,R., Martensson,I.L., Toresson,H., Fox,M., Wales,J.K., Hindmarsh,P.C., Krauss,S., Beddington,R.S., and Robinson,I.C. (1998). Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat. Genet.* 19, 125-133.
- Davis,L.G., Dibner,M.D., and Battey,J.F. (1986). *Methods in molecular biology.* (New York: Elsevier Science Publishing Co, Inc.).
- de la Cruz,J.M., Bamford,R.N., Burdine,R.D., Roessler,E., Barkovich,A.J., Donnai,D., Schier,A.F., and Muenke,M. (2002). A loss-of-function mutation in the CFC domain of TDGF1 is associated with human forebrain defects. *Hum. Genet.* 110, 422-428.
- De Robertis,E.M., Larrain,J., Oelgeschlager,M., and Wessely,O. (2000). The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nature Reviews Genetics* 1, 171-181.
- Echelard,Y., Epstein,D.J., St Jacques,B., Shen,L., Mohler,J., McMahon,J.A., and McMahon,A.P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.
- Ermakova,G.V., Alexandrova,E.M., Kazanskaya,O.V., Vasiliev,O.L., Smith,M.W., and Zaraksky,A.G. (1999). The homeobox gene, Xanf-1, can control both neural differentiation and patterning in

- the presumptive anterior neurectoderm of the *Xenopus laevis* embryo. *Development* **126**, 4513-4523.
- Fedi,P., Bafico,A., Nieto,S.A., Burgess,W.H., Miki,T., Bottaro,D.P., Kraus,M.H., and Aaronson,S.A. (1999). Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **274**, 19465-19472.
- Fode,C., Ma,Q., Casarosa,S., Ang,S.L., Anderson,D.J., and Guillemot,F. (2000). A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons. *Genes Dev.* **14**, 67-80.
- Forbes,A.J., Nakano,Y., Taylor,A.M., and Ingham,P.W. (1993). Genetic analysis of hedgehog signalling in the *Drosophila* embryo. *Dev. Suppl* 115-124.
- Furukawa,T., Kozak,C.A., and Cepko,C.L. (1997). *rax*, a novel paired-type homeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 3088-3093.
- Galceran,J., Miyashita-Lin,E.M., Devaney,E., Rubenstein,J.L., and Grosschedl,R. (2000). Hippocampus development and generation of dentate gyrus granule cells is regulated by LEF1. *Development* **127**, 469-482.
- Gerhart,J. (1999). 1998 Warkany lecture: signaling pathways in development. *Teratology* **60**, 226-239.
- Glinka,A., Wu,W., Delius,H., Monaghan,A.P., Blumenstock,C., and Niehrs,C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* **391**, 357-362.
- Golden,J.A., Bracilovic,A., McFadden,K.A., Beesley,J.S., Rubenstein,J.L., and Grinspan,J.B. (1999). Ectopic bone morphogenetic proteins 5 and 4 in the chicken forebrain lead to cyclopia and holoprosencephaly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 2439-2444.
- Greaves,S. (2002). Getting legless with a *Pygopus*. *Nat. Cell Biol.* **4**, E124.
- Grinblat,Y., Gamse,J., Patel,M., and Sive,H. (1998). Determination of the zebrafish forebrain: induction and patterning. *Development* **125**, 4403-4416.
- Gripp,K.W., Wotton,D., Edwards,M.C., Roessler,E., Ades,L., Meinecke,P., Richieri-Costa,A., Zackai,E.H., Massague,J., Muenke,M., and Elledge,S.J. (2000). Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. *Nat. Genet.* **25**, 205-208.
- Hall,A.C., Lucas,F.R., and Salinas,P.C. (2000). Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell* **100**, 525-535.
- Hart,M., Concordet,J.P., Lassot,I., Albert,I., del los,S.R., Durand,H., Perret,C., Rubinfeld,B., Margottin,F., Benarous,R., and Polakis,P. (1999). The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr. Biol.* **9**, 207-210.

- Hart,M.J., los Santos,R., Albert,I.N., Rubinfeld,B., and Polakis,P. (1998). Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Current Biology* 8, 573-581.
- Hecht,A., Vleminckx,K., Stemmler,M.P., van Roy,F., and Kemler,R. (2000). The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *EMBO J.* 19, 1839-1850.
- Hedgepeth,C.M., Deardorff,M.A., and Klein,P.S. (1999). Xenopus axin interacts with glycogen synthase kinase-3 beta and is expressed in the anterior midbrain. *Mechanisms of Development* 80, 147-151.
- Heisenberg,C.P., Houart,C., Take-uchi,M., Rauch,G.J., Young,N., Coutinho,P., Masai,I., Caneparo,L., Concha,M.L., Geisler,R., Dale,T.C., Wilson,S.W., and Stemple,D.L. (2001). A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish Masterblind/Axin1 leads to a fate transformation of telencephalon and eyes to diencephalon. *Genes & Development* 15, 1427-1434.
- Hepker,J., Wang,Q.T., Motzny,C.K., Holmgren,R., and Orenic,T.V. (1997). *Drosophila cubitus interruptus* forms a negative feedback loop with patched and regulates expression of Hedgehog target genes. *Development* 124, 549-558.
- Hioki,K., Shivapurkar,N., Oshima,H., Alabaster,O., Oshima,M., and Taketo,M.M. (1997). Suppression of intestinal polyp development by low-fat and high-fiber diet in Apc(Delta 716) knockout mice. *Carcinogenesis* 18, 1863-1865.
- Hobmayer,B., Rentzsch,F., Kuhn,K., Happel,C.M., von Laue,C.C., Snyder,P., Rothbacher,U., and Holstein,T.W. (2000). WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan Hydra. *Nature* 407, 186-189.
- Hogan,B.L., Horsburgh,G., Cohen,J., Hetherington,C.M., Fisher,G., and Lyon,M.F. (1986). Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 97, 95-110.
- Hooper,J.E. and Scott,M.P. (1989). The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* 59, 751-765.
- Hooper,M., Hardy,K., Handyside,A., Hunter,S., and Monk,M. (1987). Hprt-Deficient (Lesch-Nyhan) Mouse Embryos Derived from Germline Colonization by Cultured-Cells. *Nature* 326, 292-295.
- Houart,C., Westerfield,M., and Wilson,S.W. (1998). A small population of anterior cells patterns the forebrain during zebrafish gastrulation. *Nature* 391, 788-792.
- Hsu,W., Zeng,L., and Costantini,F. (1999). Identification of a domain of axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. *Journal of Biological Chemistry* 274, 3439-3445.
- Huelsken, J. Über die Rolle von beta-Catenin bei der Zelladhäsion und Signaltransduktion in der

- frühen Mausembryogenese. (1998). Ref Type: Thesis/Dissertation
- Huelsken,J. and Birchmeier,W. (2001). New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 547-553.
- Huelsken,J., Vogel,R., Brinkmann,V., Erdmann,B., Birchmeier,C., and Birchmeier,W. (2000). Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *Journal of Cell Biology* 148, 567-578.
- Huelsken,J., Vogel,R., Erdmann,B., Cotsarelis,G., and Birchmeier,W. (2001). beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* 105, 533-545.
- Hui,C.C., Slusarski,D., Platt,K.A., Holmgren,R., and Joyner,A.L. (1994). Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene *cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli-2*, and *Gli-3*, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. *Dev. Biol.* 162, 402-413.
- Hunter,T. (1997). Oncoprotein networks. *Cell* 88, 333-346.
- Ikeda,S., Kishida,S., Yamamoto,H., Murai,H., Koyama,S., and Kikuchi,A. (1998). Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and beta-catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J.* 17, 1371-1384.
- Incardona,J.P., Gaffield,W., Kapur,R.P., and Roelink,H. (1998). The teratogenic *Veratrum* alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* 125, 3553-3562.
- Ingham,P.W. and McMahon,A.P. (2001). Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* 15, 3059-3087.
- Inoue,T., Nakamura,S., and Osumi,N. (2000). Fate mapping of the mouse prosencephalic neural plate. *Dev. Biol.* 219, 373-383.
- Ishitani,T., Ninomiya-Tsuji,J., Nagai,S., Nishita,M., Meneghini,M., Barker,N., Waterman,M., Bowerman,B., Clevers,H., Shibuya,H., and Matsumoto,K. (1999). The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature* 399, 798-802.
- Jho,E.H., Zhang,T., Domon,C., Joo,C.K., Freund,J.N., and Costantini,F. (2002). Wnt/beta-catenin/TCF signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology* 22, 1172-1183.
- Jia,J., Amanai,K., Wang,G., Tang,J., Wang,B., and Jiang,J. (2002). Shaggy/GSK3 antagonizes Hedgehog signalling by regulating *Cubitus interruptus*. *Nature* 416, 548-552.
- Jiang,J. (2002). Degrading Ci: who is Cul-pable? *Genes Dev.* 16, 2315-2321.
- Jiang,J. and Struhl,G. (1998). Regulation of the Hedgehog and Wingless signalling pathways by the F-box/WD40-repeat protein Slimb. *Nature* 391, 493-496.

- Karlstrom,R.O., Talbot,W.S., and Schier,A.F. (1999). Comparative synteny cloning of zebrafish you-too: mutations in the Hedgehog target *gli2* affect ventral forebrain patterning. *Genes Dev.* 13, 388-393.
- Kawahara,K., Morishita,T., Nakamura,T., Hamada,F., Toyoshima,K., and Akiyama,T. (2000). Down-regulation of beta-catenin by the colorectal tumor suppressor APC requires association with Axin and beta-catenin. *J. Biol. Chem.* 275, 8369-8374.
- Kim,C.H., Oda,T., Itoh,M., Jiang,D., Artinger,K.B., Chandrasekharappa,S.C., Driever,W., and Chitnis,A.B. (2000). Repressor activity of headless/TCF3 is essential for vertebrate head formation. *Nature* 407, 913-916.
- Kinzler,K.W., Bigner,S.H., Bigner,D.D., Trent,J.M., Law,M.L., O'Brien,S.J., Wong,A.J., and Vogelstein,B. (1987). Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 236, 70-73.
- Kinzler,K.W., Nilbert,M.C., Su,L.K., Vogelstein,B., Bryan,T.M., Levy,D.B., Smith,K.J., Preisinger,A.C., Hedge,P., McKechnie,D., and . (1991). Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253, 661-665.
- Kinzler,K.W., Ruppert,J.M., Bigner,S.H., and Vogelstein,B. (1988). The *GLI* gene is a member of the Kruppel family of zinc finger proteins. *Nature* 332, 371-374.
- Kinzler,K.W. and Vogelstein,B. (1990). The *GLI* gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol. Cell Biol.* 10, 634-642.
- Kishida,S., Yamamoto,H., Ikeda,S., Kishida,M., Sakamoto,I., Koyama,S., and Kikuchi,A. (1998). Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J. Biol. Chem.* 273, 10823-10826.
- Klingensmith,J., Nusse,R., and Perrimon,N. (1994). The *Drosophila* segment polarity gene *dishevelled* encodes a novel protein required for response to the wingless signal. *Genes Dev.* 8, 118-130.
- Knoetgen,H., Teichmann,U., and Kessel,M. (1999). Head-organizing activities of endodermal tissues in vertebrates. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* 45, 481-492.
- Kobayashi,M., Toyama,R., Takeda,H., Dawid,I.B., and Kawakami,K. (1998). Overexpression of the forebrain-specific homeobox gene *six3* induces rostral forebrain enlargement in zebrafish. *Development* 125, 2973-2982.
- Koyabu,Y., Nakata,K., Mizugishi,K., Aruga,J., and Mikoshiba,K. (2001). Physical and functional interactions between Zic and Gli proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 6889-6892.
- Kramps,T., Peter,O., Brunner,E., Nellen,D., Froesch,B., Chatterjee,S., Murone,M., Zullig,S., and Basler,K. (2002). Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 109, 47-60.
- Kuhl,M., Sheldahl,L.C., Park,M., Miller,J.R., and Moon,R.T. (2000). The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new

- vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* **16**, 279-283.
- Kuhn,R., Rajewsky,K., and Muller,W. (1991). Generation and Analysis of Interleukin-4 Deficient Mice. *Science* **254**, 707-710.
- Larabell,C.A., Torres,M., Rowning,B.A., Yost,C., Miller,J.R., Wu,M., Kimelman,D., and Moon,R.T. (1997). Establishment of the dorso-ventral axis in *Xenopus* embryos is presaged by early asymmetries in beta-catenin that are modulated by the Wnt signaling pathway. *J. Cell Biol.* **136**, 1123-1136.
- Lee,C.S., Buttitia,L., and Fan,C.M. (2001). Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of sonic hedgehog signaling in the somite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 11347-11352.
- Lee,J., Platt,K.A., Censullo,P., and Altaba,A. (1997). Gli1 is a target of Sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* **124**, 2537-2552.
- Lee,J.D. and Treisman,J.E. (2001). Sightless has homology to transmembrane acyltransferases and is required to generate active Hedgehog protein. *Curr. Biol.* **11**, 1147-1152.
- Lee,J.J., Ekker,S.C., von Kessler,D.P., Porter,J.A., Sun,B.I., and Beachy,P.A. (1994). Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* **266**, 1528-1537.
- Lewis,P.M., Dunn,M.P., McMahon,J.A., Logan,M., Martin,J.F., St Jacques,B., and McMahon,A.P. (2001). Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. *Cell* **105**, 599-612.
- Liu,C., Li,Y., Semenov,M., Han,C., Baeg,G.H., Tan,Y., Zhang,Z., Lin,X., and He,X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* **108**, 837-847.
- Liu,W., Dong,X., Mai,M., Seelan,R.S., Taniguchi,K., Krishnadath,K.K., Halling,K.C., Cunningham,J.M., Boardman,L.A., Qian,C., Christensen,E., Schmidt,S.S., Roche,P.C., Smith,D.I., and Thibodeau,S.N. (2000). Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat. Genet.* **26**, 146-147.
- Lustig,B., Jerchow,B., Sachs,M., Weiler,S., Pietsch,T., Karsten,U., van de Wetering,M., Clevers,H., Schlag,P.M., Birchmeier,W., and Behrens,J. (2002). Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/Axin2 in colorectal and liver tumors. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 1184-1193.
- Mao,B., Wu,W., Li,Y., Hoppe,D., Stannek,P., Glinka,A., and Niehrs,C. (2001). LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* **411**, 321-325.
- Marcorelles,P., Loget,P., Fallet-Bianco,C., Roume,J., Encha-Razavi,F., and Delezoide,A.L. (2002). Unusual variant of holoprosencephaly in monosomy 13q. *Pediatr. Dev. Pathol.* **5**, 170-178.
- Marigo,V., Johnson,R.L., Vortkamp,A., and Tabin,C.J. (1996a). Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev. Biol.* **180**, 273-283.

- Marigo,V., Scott,M.P., Johnson,R.L., Goodrich,L.V., and Tabin,C.J. (1996b). Conservation in hedgehog signaling: induction of a chicken patched homolog by Sonic hedgehog in the developing limb. *Development* 122, 1225-1233.
- Marigo,V. and Tabin,C.J. (1996). Regulation of patched by sonic hedgehog in the developing neural tube. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 9346-9351.
- Marin,O., Anderson,S.A., and Rubenstein,J.L. (2000). Origin and molecular specification of striatal interneurons. *J. Neurosci.* 20, 6063-6076.
- Marti,E. and Bovolenta,P. (2002). Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends Neurosci.* 25, 89-96.
- Mastick,G.S., Fan,C.M., Tessier-Lavigne,M., Serbedzija,G.N., McMahon,A.P., and Easter,S.S., Jr. (1996). Early deletion of neuromeres in Wnt-1-/- mutant mice: evaluation by morphological and molecular markers. *J. Comp Neurol.* 374, 246-258.
- Masuya,H., Sagai,T., Wakana,S., Moriwaki,K., and Shiroishi,T. (1995). A duplicated zone of polarizing activity in polydactylous mouse mutants. *Genes Dev.* 9, 1645-1653.
- Matsunaga,E. and Shiota,K. (1977). Holoprosencephaly in human embryos: epidemiologic studies of 150 cases. *Teratology* 16, 261-272.
- McMahon,A.P. and Bradley,A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell* 62, 1073-1085.
- McMahon,A.P., Joyner,A.L., Bradley,A., and McMahon,J.A. (1992). The midbrain-hindbrain phenotype of Wnt-1/Wnt-1- mice results from stepwise deletion of engrailed-expressing cells by 9.5 days postcoitum. *Cell* 69, 581-595.
- Micchelli,C.A., The,I., Selva,E., Mogila,V., and Perrimon,N. (2002). Rasp, a putative transmembrane acyltransferase, is required for Hedgehog signaling. *Development* 129, 843-851.
- Ming,J.E., Kaupas,M.E., Roessler,E., Brunner,H.G., Golabi,M., Tekin,M., Stratton,R.F., Sujansky,E., Bale,S.J., and Muenke,M. (2002). Mutations in PATCHED-1, the receptor for SONICHEDGEHOG, are associated with holoprosencephaly. *Human Genetics* 110, 297-301.
- Ming,J.E. and Muenke,M. (2002). Multiple Hits during Early Embryonic Development: Digenic Diseases and Holoprosencephaly. *American Journal of Human Genetics* 71, 1017-1032.
- Miyaki,M., Konishi,M., Kikuchi-Yanoshita,R., Enomoto,M., Igari,T., Tanaka,K., Muraoka,M., Takahashi,H., Amada,Y., Fukayama,M., and . (1994). Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res.* 54, 3011-3020.
- Miyoshi,Y., Nagase,H., Ando,H., Horii,A., Ichii,S., Nakatsuru,S., Aoki,T., Miki,Y., Mori,T., and Nakamura,Y. (1992). Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum. Mol. Genet.* 1, 229-233.
- Mizugishi,K., Aruga,J., Nakata,K., and Mikoshiba,K. (2001). Molecular properties of Zic proteins as

- transcriptional regulators and their relationship to GLI proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 2180-2188.
- Molenaar, M., van de, W.M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O., and Clevers, H. (1996). XTCF-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86, 391-399.
- Moon, R.T. and Kimelman, D. (1998). From cortical rotation to organizer gene expression: toward a molecular explanation of axis specification in *Xenopus*. *Bioessays* 20, 536-545.
- Morin, P.J. (1999). beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 21, 1021-1030.
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Activation of beta-catenin-TCF signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-1790.
- Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., Mcneley, M.K., Shoemaker, A.R., and Dove, W.F. (1995a). Apc(Min) - A Mouse Model for Intestinal and Mammary Tumorigenesis. *European Journal of Cancer* 31A, 1061-1064.
- Moser, A.R., Shoemaker, A.R., Connelly, C.S., Clipson, L., Gould, K.A., Luongo, C., Dove, W.F., Siggers, P.H., and Gardner, R.L. (1995b). Homozygosity for the Min Allele of Apc Results in Disruption of Mouse Development Prior to Gastrulation. *Developmental Dynamics* 203, 422-433.
- Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C., Chen, L., Tsukui, T., Gomer, L., Dorward, D.W., Glinka, A., Grinberg, A., Huang, S.P., Niehrs, C., Belmonte, J.C.I., and Westphal, H. (2001). Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Developmental Cell* 1, 423-434.
- Muller, F., Albert, S., Blader, P., Fischer, N., Hallonet, M., and Strahle, U. (2000). Direct action of the nodal-related signal cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS. *Development* 127, 3889-3897.
- Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., and Polakis, P. (1995). Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 3046-3050.
- Murone, M., Rosenthal, A., and de Sauvage, F.J. (1999). Sonic hedgehog signaling by the patched-smoothed receptor complex. *Curr. Biol.* 9, 76-84.
- Mutanen, M., Pajari, A.M., and Oikarinen, S.I. (2000). Beef induces and rye bran prevents the formation of intestinal polyps in Apc(Min) mice: relation to beta-catenin and PKC isozymes. *Carcinogenesis* 21, 1167-1173.
- Nagai, T., Aruga, J., Minowa, O., Sugimoto, T., Ohno, Y., Noda, T., and Mikoshiba, K. (2000). Zic2 regulates the kinetics of neurulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1618-1623.

- Nagase,H. and Nakamura,Y. (1993). Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum. Mutat.* 2, 425-434.
- Nakamura,T., Hamada,F., Ishidate,T., Anai,K., Kawahara,K., Toyoshima,K., and Akiyama,T. (1998). Axin, an inhibitor of the Wnt signalling pathway, interacts with beta-catenin, GSK-3 beta and APC and reduces the beta-catenin level. *Genes to Cells* 3, 395-403.
- Nakano,Y., Guerrero,I., Hidalgo,A., Taylor,A., Whittle,J.R., and Ingham,P.W. (1989). A protein with several possible membrane-spanning domains encoded by the *Drosophila* segment polarity gene patched. *Nature* 341, 508-513.
- Nanni,L., Ming,J.E., Bocian,M., Steinhaus,K., Bianchi,D.W., Die-Smulders,C., Giannotti,A., Imaizumi,K., Jones,K.L., Campo,M.D., Martin,R.A., Meinecke,P., Pierpont,M.E., Robin,N.H., Young,I.D., Roessler,E., and Muenke,M. (1999). The mutational spectrum of the sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2479-2488.
- Nanni,L., Schelper,R.L., and Muenke,M. (2000). Molecular genetics of holoprosencephaly. *Frontiers in Bioscience* 5, D334-D342.
- Niehrs,C. (1999). Head in the WNT - the molecular nature of Spemann's head organizer. *Trends in Genetics* 15, 314-319.
- Nishita,M., Hashimoto,M.K., Ogata,S., Laurent,M.N., Ueno,N., Shibuya,H., and Cho,K.W. (2000). Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer. *Nature* 403, 781-785.
- Noordermeer,J., Klingensmith,J., Perrimon,N., and Nusse,R. (1994). dishevelled and armadillo act in the wingless signalling pathway in *Drosophila*. *Nature* 367, 80-83.
- Nusse,R. (1999). WNT targets. Repression and activation. *Trends Genet.* 15, 1-3.
- Nusse, R. The Wnt gene Homepage. <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html> . 11-10-2002. Ref Type: Electronic Citation
- Nusse,R., van Ooyen,A., Cox,D., Fung,Y.K., and Varmus,H. (1984). Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15. *Nature* 307, 131-136.
- Nusse,R. and Varmus,H.E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99-109.
- Nusslein-Volhard,C. and Wieschaus,E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Nybakken,K. and Perrimon,N. (2002). Hedgehog signal transduction: recent findings. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 503.
- Nybakken,K.E., Turck,C.W., Robbins,D.J., and Bishop,J.M. (2002). Hedgehog-stimulated phosphorylation of the kinesin-related protein Costal2 is mediated by the serine/threonine

- kinase fused. *J. Biol. Chem.* 277, 24638-24647.
- Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Gruss, P. (1995). Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* 121, 4045-4055.
- Olivier, C., Cobos, I., Villegas, E.M.P., Spassky, N., Zalc, B., Martinez, S., and Thomas, J.L. (2001). Monofocal origin of telencephalic oligodendrocytes in the anterior entopeduncular area of the chick embryo. *Development* 128, 1757-1769.
- Ono, K., Yasui, Y., Rutishauser, U., and Miller, R.H. (1997). Focal ventricular origin and migration of oligodendrocyte precursors into the chick optic nerve. *Neuron* 19, 283-292.
- Orenic, T.V., Slusarski, D.C., Kroll, K.L., and Holmgren, R.A. (1990). Cloning and characterization of the segment polarity gene cubitus interruptus Dominant of *Drosophila*. *Genes Dev.* 4, 1053-1067.
- Parker, D.S., Jemison, J., and Cadigan, K.M. (2002). Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wingless signaling in *Drosophila*. *Development* 129, 2565-2576.
- Parr, B.A. and McMahon, A.P. (1995). Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature* 374, 350-353.
- Pasquier, L., Dubourg, C., Blayau, M., Lazaro, L., Le Marec, B., David, V., and Odent, S. (2000). A new mutation in the six-domain of SIX3 gene causes holoprosencephaly. *Eur. J. Hum. Genet.* 8, 797-800.
- Pearse, R.V., Collier, L.S., Scott, M.P., and Tabin, C.J. (1999). Vertebrate homologs of *Drosophila* suppressor of fused interact with the gli family of transcriptional regulators. *Dev. Biol.* 212, 323-336.
- Peifer, M. and Wieschaus, E. (1990). The segment polarity gene armadillo encodes a functionally modular protein that is the *Drosophila* homolog of human plakoglobin. *Cell* 63, 1167-1176.
- Pepinsky, R.B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D.P., Williams, K.P., Bixler, S.A., Ambrose, C.M., Garber, E.A., Miatkowski, K., Taylor, F.R., Wang, E.A., and Galdes, A. (1998). Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* 273, 14037-14045.
- Perea-Gomez, A., Rhinn, M., and Ang, S.L. (2001). Role of the anterior visceral endoderm in restricting posterior signals in the mouse embryo. *Int. J. Dev. Biol.* 45, 311-320.
- Perry, W.L., Vasicek, T.J., Lee, J.J., Rossi, J.M., Zeng, L., Zhang, T., Tilghman, S.M., and Costantini, F. (1995). Phenotypic and Molecular Analysis of A Transgenic Insertional Allele of the Mouse Fused Locus. *Genetics* 141, 321-332.
- Peters, J.M., McKay, R.M., McKay, J.P., and Graff, J.M. (1999). Casein kinase I transduces Wnt signals. *Nature* 401, 345-350.
- Picard, D. and Yamamoto, K.R. (1987). 2 Signals Mediate Hormone-Dependent Nuclear-Localization of the Glucocorticoid Receptor. *Embo Journal* 6, 3333-3340.

- Piccolo,S., Agius,E., Leyns,L., Bhattacharyya,S., Grunz,H., Bouwmeester,T., and De Robertis,E.M. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397, 707-710.
- Polakis,P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14, 1837-1851.
- Porter,J.A., Young,K.E., and Beachy,P.A. (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 274, 255-259.
- Preat,T., Therond,P., Lamour-Isnard,C., Limbourg-Bouchon,B., Tricoire,H., Erk,I., Mariol,M.C., and Busson,D. (1990). A putative serine/threonine protein kinase encoded by the segment-polarity fused gene of *Drosophila*. *Nature* 347, 87-89.
- Price,M.A. and Kalderon,D. (1999). Proteolysis of cubitus interruptus in *Drosophila* requires phosphorylation by protein kinase A. *Development* 126, 4331-4339.
- Price,M.A. and Kalderon,D. (2002). Proteolysis of the Hedgehog signaling effector Cubitus interruptus requires phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase 3 and Casein Kinase 1. *Cell* 108, 823-835.
- Puelles,L. (2001). Brain segmentation and forebrain development in amniotes. *Brain Res. Bull.* 55, 695-710.
- Ramirez-Solis,R., Rivera-Perez,J., Wallace,J.D., Wims,M., Zheng,H., and Bradley,A. (1992). Genomic DNA microextraction: a method to screen numerous samples. *Anal. Biochem.* 201, 331-335.
- Rattner,A., Hsieh,J.C., Smallwood,P.M., Gilbert,D.J., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., and Nathans,J. (1997). A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 2859-2863.
- Riethmacher,D., Brinkmann,V., and Birchmeier,C. (1995). A Targeted Mutation in the Mouse E-Cadherin Gene Results in Defective Preimplantation Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 855-859.
- Roach,E., Demyer,W., Conneally,P.M., Palmer,C., and Merritt,A.D. (1975). Holoprosencephaly: birth data, benetic and demographic analyses of 30 families. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 11, 294-313.
- Robbins,D.J., Nybakken,K.E., Kobayashi,R., Sisson,J.C., Bishop,J.M., and Therond,P.P. (1997). Hedgehog elicits signal transduction by means of a large complex containing the kinesin-related protein costal2. *Cell* 90, 225-234.
- Roessler,E., Belloni,E., Gaudenz,K., Jay,P., Berta,P., Scherer,S.W., Tsui,L.C., and Muenke,M. (1996). Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat. Genet.* 14, 357-360.
- Roessler,E., Belloni,E., Gaudenz,K., Vargas,F., Scherer,S.W., Tsui,L.C., and Muenke,M. (1997). Mutations in the C-terminal domain of Sonic Hedgehog cause holoprosencephaly. *Hum. Mol.*

- Genet. 6, 1847-1853.
- Roose,J., Molenaar,M., Peterson,J., Hurenkamp,J., Brantjes,H., Moerer,P., van de Wetering,M., Destree,O., and Clevers,H. (1998). The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395, 608-612.
- Rousset,R., Mack,J.A., Wharton,K.A., Jr., Axelrod,J.D., Cadigan,K.M., Fish,M.P., Nusse,R., and Scott,M.P. (2001). Naked cuticle targets dishevelled to antagonize Wnt signal transduction. *Genes Dev.* 15, 658-671.
- Rubenstein,J.L., Shimamura,K., Martinez,S., and Puelles,L. (1998). Regionalization of the prosencephalic neural plate. *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 445-477.
- Rubinfeld,B., Albert,I., Porfiri,E., Fiol,C., Munemitsu,S., and Polakis,P. (1996). Binding of GSK3 β to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272, 1023-1026.
- Rubinfeld,B., Robbins,P., El Gamil,M., Albert,I., Porfiri,E., and Polakis,P. (1997). Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275, 1790-1792.
- Rubinfeld,B., Tice,D.A., and Polakis,P. (2001). Axin-dependent phosphorylation of the adenomatous polyposis coli protein mediated by casein kinase 1 ϵ . *J. Biol. Chem.* 276, 39037-39045.
- Ruiz,I.A., Palma,V., and Dahmane,N. (2002). Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 24-33.
- Ruiz,P., Brinkmann,V., Ledermann,B., Behrend,M., Grund,C., Thalhammer,C., Vogel,F., Birchmeier,C., Gunthert,U., Franke,W.W., and Birchmeier,W. (1996). Targeted mutation of plakoglobin in mice reveals essential functions of desmosomes in the embryonic heart. *J. Cell Biol.* 135, 215-225.
- Ruppert,J.M., Kinzler,K.W., Wong,A.J., Bigner,S.H., Kao,F.T., Law,M.L., Seuanez,H.N., O'Brien,S.J., and Vogelstein,B. (1988). The GLI-Kruppel family of human genes. *Mol. Cell Biol.* 8, 3104-3113.
- Ruppert,J.M., Vogelstein,B., Arheden,K., and Kinzler,K.W. (1990). GLI3 encodes a 190-kilodalton protein with multiple regions of GLI similarity. *Mol. Cell Biol.* 10, 5408-5415.
- Sakanaka,C., Leong,P., Xu,L., Harrison,S.D., and Williams,L.T. (1999). Casein kinase 1 ϵ in the wnt pathway: regulation of beta-catenin function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 12548-12552.
- Sakanaka,C. and Williams,L.T. (1999). Functional domains of axin. Importance of the C terminus as an oligomerization domain. *J. Biol. Chem.* 274, 14090-14093.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sasaki,H., Nishizaki,Y., Hui,C., Nakafuku,M., and Kondoh,H. (1999). Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary

- mediators of Shh signaling. *Development* 126, 3915-3924.
- Satoh,S., Daigo,Y., Furukawa,Y., Kato,T., Miwa,N., Nishiwaki,T., Kawasoe,T., Ishiguro,H., Fujita,M., Tokino,T., Sasaki,Y., Imaoka,S., Murata,M., Shimano,T., Yamaoka,Y., and Nakamura,Y. (2000). AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat. Genet.* 24, 245-250.
- Schneider,S., Steinbeisser,H., Warga,R.M., and Hausen,P. (1996). Beta-catenin translocation into nuclei demarcates the dorsalizing centers in frog and fish embryos. *Mech. Dev.* 57, 191-198.
- Schwarz-Romond,T., Asbrand,C., Bakkers,J., Kuhl,M., Schaeffer,H.J., Huelsken,J., Behrens,J., Hammerschmidt,M., and Birchmeier,W. (2002). The ankyrin repeat protein Diversin recruits Casein kinase I epsilon to the beta-catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Genes & Development* 16, 2073-2084.
- Semenov,M.V., Tamai,K., Brott,B.K., Kuhl,M., Sokol,S., and He,X. (2001). Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr. Biol.* 11, 951-961.
- Shimamura,K. and Rubenstein,J.L. (1997). Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* 124, 2709-2718.
- Shimizu,Y., Ikeda,S., Fujimori,M., Kodama,S., Nakahara,M., Okajima,M., and Asahara,T. (2002). Frequent alterations in the Wnt signaling pathway in colorectal cancer with microsatellite instability. *Genes Chromosomes Cancer* 33, 73-81.
- Shivapurkar,N., Tang,Z.C., and Alabaster,O. (1992). The Effect of High-Risk and Low-Risk Diets on Aberrant Crypt and Colonic Tumor-Formation in Fischer-344 Rats. *Carcinogenesis* 13, 887-890.
- Shu,W., Jiang,Y.Q., Lu,M.M., and Morrissey,E.E. (2002). Wnt7b regulates mesenchymal proliferation and vascular development in the lung. *Development* 129, 4831-4842.
- Slusarski,D.C., Corces,V.G., and Moon,R.T. (1997). Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390, 410-413.
- Smits,R., Kielman,M.F., Breukel,C., Zurcher,C., Neufeld,K., Jagmohan-Changur,S., Hofland,N., van Dijk,J., White,R., Edelmann,W., Kucherlapati,R., Khan,P.M., and Fodde,R. (1999). Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes Dev.* 13, 1309-1321.
- Sokol,S., Christian,J.L., Moon,R.T., and Melton,D.A. (1991). Injected Wnt Rna Induces A Complete Body Axis in Xenopus Embryos. *Cell* 67, 741-752.
- Solnica-Krezel,L. (1999). Pattern formation in zebrafish--fruitful liaisons between embryology and genetics. *Curr. Top. Dev. Biol.* 41, 1-35.
- Spassky,N., Olivier,C., Cobos,I., LeBras,B., Goujet-Zalc,C., Martinez,S., Zalc,B., and Thomas,J.L. (2001). The early steps of oligodendrogenesis: Insights from the study of the plp lineage in the

- brain of chicks and rodents. *Developmental Neuroscience* 23, 318-326.
- Stark,K., Vainio,S., Vassileva,G., and McMahon,A.P. (1994). Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 372, 679-683.
- Stone,D.M., Hynes,M., Armanini,M., Swanson,T.A., Gu,Q., Johnson,R.L., Scott,M.P., Pennica,D., Goddard,A., Phillips,H., Noll,M., Hooper,J.E., de Sauvage,F., and Rosenthal,A. (1996). The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 384, 129-134.
- Strovel,E.T., Wu,D., and Sussman,D.J. (2000). Protein phosphatase 2C α dephosphorylates axin and activates LEF-1-dependent transcription. *J. Biol. Chem.* 275, 2399-2403.
- Su,L.K., Kinzler,K.W., Vogelstein,B., Preisinger,A.C., Moser,A.R., Luongo,C., Gould,K.A., and Dove,W.F. (1992). Multiple Intestinal Neoplasia Caused by A Mutation in the Murine Homolog of the Apc Gene. *Science* 256, 668-670.
- Sun,T.Q., Lu,B., Feng,J.J., Reinhard,C., Jan,Y.N., Fantl,W.J., and Williams,L.T. (2001). PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling. *Nat. Cell Biol.* 3, 628-636.
- Sussel,L., Marin,O., Kimura,S., and Rubenstein,J.L. (1999). Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* 126, 3359-3370.
- Sussman,D.J., Klingensmith,J., Salinas,P., Adams,P.S., Nusse,R., and Perrimon,N. (1994). Isolation and characterization of a mouse homolog of the *Drosophila* segment polarity gene dishevelled. *Dev. Biol.* 166, 73-86.
- Tabata,T. and Kornberg,T.B. (1994). Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 76, 89-102.
- Tago,K., Nakamura,T., Nishita,M., Hyodo,J., Nagai,S., Murata,Y., Adachi,S., Ohwada,S., Morishita,Y., Shibuya,H., and Akiyama,T. (2000). Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev.* 14, 1741-1749.
- Taipale,J., Cooper,M.K., Maiti,T., and Beachy,P.A. (2002). Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature* 418, 892-897.
- Takemaru,K.I. and Moon,R.T. (2000). The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J. Cell Biol.* 149, 249-254.
- Tamai,K., Semenov,M., Kato,Y., Spokony,R., Liu,C., Katsuyama,Y., Hess,F., Saint-Jeannet,J.P., and He,X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530-535.
- Taylor,A.M., Nakano,Y., Mohler,J., and Ingham,P.W. (1993). Contrasting distributions of patched and hedgehog proteins in the *Drosophila* embryo. *Mech. Dev.* 42, 89-96.
- The,I., Bellaiche,Y., and Perrimon,N. (1999). Hedgehog movement is regulated through tout velu-

- dependent synthesis of a heparan sulfate proteoglycan. *Mol. Cell* 4, 633-639.
- Theil,T., Alvarez-Bolado,G., Walter,A., and Ruther,U. (1999). Gli3 is required for Emx gene expression during dorsal telencephalon development. *Development* 126, 3561-3571.
- Thomas,K.R. and Capecchi,M.R. (1987). Site-Directed Mutagenesis by Gene Targeting in Mouse Embryo-Derived Stem-Cells. *Cell* 51, 503-512.
- Thomas,K.R. and Capecchi,M.R. (1990). Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature* 346, 847-850.
- Thomas,K.R., Musci,T.S., Neumann,P.E., and Capecchi,M.R. (1991). Swaying is a mutant allele of the proto-oncogene Wnt-1. *Cell* 67, 969-976.
- Tole,S., Ragsdale,C.W., and Grove,E.A. (2000). Dorsoventral patterning of the telencephalon is disrupted in the mouse mutant extra-toes(J). *Dev. Biol.* 217, 254-265.
- van de Water,S., van de Wetering,M., Joore,J., Esseling,J., Bink,R., Clevers,H., and Zivkovic,D. (2001). Ectopic Wnt signal determines the eyeless phenotype of zebrafish masterblind mutant. *Development* 128, 3877-3888.
- van Ooyen,A. and Nusse,R. (1984). Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene int-1; proviral insertions leave the protein-encoding domain intact. *Cell* 39, 233-240.
- Varga,Z.M., Wegner,J., and Westerfield,M. (1999). Anterior movement of ventral diencephalic precursors separates the primordial eye field in the neural plate and requires cyclops. *Development* 126, 5533-5546.
- Varlet,I., Collignon,J., and Robertson,E.J. (1997). nodal expression in the primitive endoderm is required for specification of the anterior axis during mouse gastrulation. *Development* 124, 1033-1044.
- von Kries,J.P., Winbeck,G., Asbrand,C., Schwarz-Romond,T., Sochnikova,N., Dell'Oro,A., Behrens,J., and Birchmeier,W. (2000). Hot spots in beta-catenin for interactions with LEF-1, conductin and APC. *Nat. Struct. Biol.* 7, 800-807.
- von Mering,C. and Basler,K. (1999). Distinct and regulated activities of human Gli proteins in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 9, 1319-1322.
- Wada,T., Kagawa,T., Ivanova,A., Zalc,B., Shirasaki,R., Murakami,F., Iemura,S., Ueno,N., and Ikenaka,K. (2000). Dorsal spinal cord inhibits oligodendrocyte development. *Developmental Biology* 227, 42-55.
- Wallis,D. and Muenke,M. (2000). Mutations in holoprosencephaly. *Human Mutation* 16, 99-108.
- Wallis,D.E., Roessler,E., Hehr,U., Nanni,L., Wiltshire,T., Richieri-Costa,A., Gillissen-Kaesbach,G., Zackai,E.H., Rommens,J., and Muenke,M. (1999). Mutations in the homeodomain of the human SIX3 gene cause holoprosencephaly. *Nat. Genet.* 22, 196-198.

- Walterhouse,D., Ahmed,M., Slusarski,D., Kalamaras,J., Boucher,D., Holmgren,R., and Iannaccone,P. (1993). *gli*, a zinc finger transcription factor and oncogene, is expressed during normal mouse development. *Dev. Dyn.* 196, 91-102.
- Wang,G., Amanai,K., Wang,B., and Jiang,J. (2000). Interactions with Costal2 and suppressor of fused regulate nuclear translocation and activity of cubitus interruptus. *Genes Dev.* 14, 2893-2905.
- Wang,G., Wang,B., and Jiang,J. (1999). Protein kinase A antagonizes Hedgehog signaling by regulating both the activator and repressor forms of Cubitus interruptus. *Genes Dev.* 13, 2828-2837.
- Webster,M.T., Rozycka,M., Sara,E., Davis,E., Smalley,M., Young,N., Dale,T.C., and Wooster,R. (2000). Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding. *Genes Chromosomes Cancer* 28, 443-453.
- Whitlock,K.E. and Westerfield,M. (2000). The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. *Development* 127, 3645-3653.
- Wieschaus,E., Nussleinvohard,C., and Jurgens,G. (1984). Mutations Affecting the Pattern of the Larval Cuticle in *Drosophila-Melanogaster* .3. Zygotic Loci on the X-Chromosome and 4Th Chromosome. *Wilhelm Rouxs Archives of Developmental Biology* 193, 296-307.
- Willert,K., Shibamoto,S., and Nusse,R. (1999). Wnt-induced dephosphorylation of axin releases beta-catenin from the axin complex. *Genes Dev.* 13, 1768-1773.
- Wilson,S.W. and Rubenstein,J.L. (2000). Induction and dorsoventral patterning of the telencephalon. *Neuron* 28, 641-651.
- Winklbauer,R., Medina,A., Swain,R.K., and Steinbeisser,H. (2001). Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation. *Nature* 413, 856-860.
- Wong,C.M., Fan,S.T., and Ng,I.O. (2001). beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer* 92, 136-145.
- Yokota,N., Nishizawa,S., Ohta,S., Date,H., Sugimura,H., Namba,H., and Maekawa,M. (2002). Role of Wnt pathway in medulloblastoma oncogenesis. *Int. J. Cancer* 101, 198-201.
- Zeng,L., Fagotto,F., Zhang,T., Hsu,W., Vasicek,T.J., Perry,W.L., Lee,J.J., Tilghman,S.M., Gumbiner,B.M., and Costantini,F. (1997). The mouse fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation. *Cell* 90, 181-192.
- Zeng,W., Wharton,K.A., Jr., Mack,J.A., Wang,K., Gadbaw,M., Suyama,K., Klein,P.S., and Scott,M.P. (2000). naked cuticle encodes an inducible antagonist of Wnt signalling. *Nature* 403, 789-795.
- Zeng,X., Goetz,J.A., Suber,L.M., Scott,W.J., Jr., Schreiner,C.M., and Robbins,D.J. (2001). A freely diffusible form of Sonic hedgehog mediates long-range signalling. *Nature* 411, 716-720.

Anhang

Publikationen

Teile dieser Arbeit sind in

Lustig,B., Jerchow,B., Sachs,M., Weiler,S., Pietsch,T., Karsten,U., van de Wetering,M., Clevers,H., Schlag,P.M., Birchmeier,W., and Behrens,J. (2002). Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/Axin2 in colorectal and liver tumors. *Molecular and Cellular Biology* 22, 1184-1193.

eingegangen.

Weitere Publikationen:

Jerchow,B.A., Huelsken,J., Costantini,F., and Birchmeier,W. Combined genetic analysis of Conductin/Axin2 and Axin in mice links Wnt-Signaling to Holoprosencephaly. Manuscript in preparation, will be submitted to *Genes & Development* in January 2003.

Behrens,J., Jerchow,B.A., Wurtele,M., Grimm,J., Asbrand,C., Wirtz,R., Kuhl,M., Wedlich,D., and Birchmeier,W. (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3 beta. *Science* 280, 596-599.

Jerchow,B.A., Huelsken,J., Costantini,F., and Birchmeier,W. (2001). Axin and Conductin play a role in head specification in mouse development. Poster presentation at the Wnt Meeting, New York, USA.

Jerchow,B.A., Behrens,J., Wurtele,M., Grimm,J., Asbrand,C., Wirtz,R., and Birchmeier,W. (1998). Functional interaction of the novel protein conductin with beta-catenin, APC. Poster presentation at the EMBL-Salk conference „Oncogenes and growth control“, Heidelberg.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel erarbeitet und verfasst habe. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt, ich habe mich nicht anderwärts um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad. Die Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin in der Fassung vom 19.06.2002 ist mir bekannt.

Lebenslauf

Boris-Alexander Jerchow

geboren am 21. Dezember 1969 in Freiburg im Breisgau

seit 1997	Promotion am Max Delbrück Centrum Berlin bei Professor Dr. W. Birchmeier
1996 – 1997	Diplomarbeit am Max Delbrück Centrum Berlin bei Professor Dr. W. Birchmeier
Sommer 1996	Zellbiologisches Praktikum am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg bei Professor Dr. W. Pyerin
1991 – 1996	Studium der Chemie an der Technischen Universität Berlin
1990 – 1991	Zivildienst in der individuellen Schwerstbehindertenbetreuung bei der Arbeiterwohlfahrt Neckargemünd
1990	Abitur am Hölderlin Gymnasium Heidelberg
1988 – 1990	Hölderlin Gymnasium Heidelberg
1988	High School-Abschluss an der High School Paxton, Illinois, USA
1987 – 1988	Auslandsaufenthalt in Paxton, Illinois, USA und Besuch der dortigen High School
1980 – 1987	Hölderlin Gymnasium Heidelberg

Danksagung

Hier endlich soll allen gedankt werden, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren und mich in den letzten Jahren durch ihre wissenschaftliche aber auch persönliche Unterstützung durch alle Höhen und Tiefen begleitet haben. Nur wenige können hier namentlich erwähnt werden:

Meinem Betreuer Prof. Dr. Walter Birchmeier danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes ..., just a joke, also noch mal:

Meinem Betreuer Prof. Dr. Walter Birchmeier danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit. Angefangen von meiner Wandlung vom Chemiker zum Biologen während meiner Diplomarbeit, hat er mich auf vielfältige Weise der „Science“ näher gebracht und meinem Projekt mit Lob, Kritik und seiner Begeisterung für neue Konzepte weitergeholfen.

Prof. Dr. Harald Saumweber möchte ich für seine Bereitschaft Danken mich beim Promotionsverfahren am Fachbereich Biologie der Humboldt Universität Berlin zu betreuen.

Prof. Dr. Jürgen Behrens möchte ich an dieser Stelle noch mal für die Betreuung meiner Diplomarbeit danken. Darüber hinaus sei die gute und immer unkomplizierte Zusammenarbeit mit ihm und Dr. Barbara Lustig (Mäuse spritzen in der Badewanne) gewürdigt.

Dr. Jörg Hülsken, ohne den ich wahrscheinlich nicht einmal wüsste, wo bei einer Maus vorne und hinten ist.

Dr. Christian Asbrand, der immer da war, wenn mal eine Hand gefehlt hat, bei weitem nicht nur im Labor.

Thomas Schwarz-Romond, der häufiges Opfer meiner Attacken war und trotzdem immer zu mir hielt.

Und natürlich dem Rest des Birchmeier-Labors, dessen Mitglieder wohl an Hilfsbereitschaft kaum zu übertreffen sind.

Nicht zuletzt gilt mein aller größter Dank meiner Frau Karoline, deren seelisch-moralische und logistische Unterstützung mich die letzten Jahren über Wasser gehalten hat und die sich immer die Zeit genommen hat, sich in meine wissenschaftlichen Ideen einzudenken und diese mit mir zu diskutieren, und meinen Kindern Karla und Luca, die es beide zu Beginn dieser Arbeit noch gar nicht gab.